
BAYERISCHE JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE

**Untersuchungen virulenzattenuierter
L. monocytogenes Stämme als
Impfstoffträger im Mausmodell**



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

vorgelegt von
Daniela Inge Martina Löffler
aus Haßfurt

Würzburg, 2006

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

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

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Neben dem akademischen Grad "Diplom-Biologin Univ." habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg,

**Doch Forschung strebt und ringt, ermüdend nie,
Nach dem Gesetz, dem Grund, Warum und Wie.**

Johann Wolfgang von Goethe

**Meinen Eltern
und Marcus**

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von November 2002 bis Mai 2006 am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. W. Goebel. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Lehrstuhl sowie für sein ständiges Interesse für diese Arbeit, dem großzügigen Freiraum innerhalb des Themengebietes und die stetige Diskussionsbereitschaft zum Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Sabine Pilgrim für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Ihre ständige Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe (Labor C216) für die ständige Hilfsbereitschaft, für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und für die gute Zusammenarbeit. Ein großes Dankeschön an Alexa Frentzen, Susanne Bauer, Martin Heisig, Christoph Schoen, Jochen Stritzker, Birgit Bergmann und Sabine Pilgrim.

Für seine engagierte Mitarbeit im Rahmen des Fortgeschrittenen-Praktikums II bedanke ich mich bei Christian Moritz.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts, die mir mit guten Ratschlägen und anregenden Diskussion weitergeholfen haben, besonders herzlichen Dank an Sonja Mertins.

Ein sehr großes Dankeschön an die Mittagsgruppe für die geselligen und unterhaltsamen Pausen.

Danken möchte ich auch dem Graduiertenkolleg 520 „Immunomodulation“ für die finanzielle Unterstützung sowie allen Graduierten für die lustigen Abende. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. J. Fensterle für die Betreuung der immunologischen Projekte und für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Eltern und meine Schwester, die mir immer hilfreich und unterstützend zur Seite gestanden haben. Auch Marcus danke ich sehr für die Unterstützung und Aufmunterung während dieser Arbeit.

| | |
|--|----|
| Zusammenfassung | 1 |
| Summary | 3 |
| Einleitung | 5 |
| 2.1 Impfstoffe | 5 |
| 2.2 Überblick über die Mechanismen des Immunschutzes | 6 |
| 2.2.1 Erkennung von Antigenen und deren Präsentation | 8 |
| 2.2.2 Die zelluläre Immunantwort (T-Lymphozyten) | 10 |
| 2.2.2.1 CD4 T-Zellen | 11 |
| 2.2.2.2 CD8 T-Zellen | 12 |
| 2.2.3 Die humorale Immunantwort (B-Zellen und Antikörper) | 12 |
| 2.2.4 Das immunologische Gedächtnis | 13 |
| 2.3 Neue Impfstofftechnologien | 14 |
| 2.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i> als Impfstoffträger | 17 |
| 2.3.1.1 Charakteristika und Klassifikation des Bakteriums <i>Listeria monocytogenes</i> | 17 |
| 2.3.1.2 Pathogenese..... | 18 |
| 2.3.1.3 Interaktionen von <i>Listeria monocytogenes</i> mit eukaryotischen Zellen und Geweben | 20 |
| 2.3.1.4 Virulenzgencluster von <i>Listeria monocytogenes</i> | 23 |
| 2.3.1.5 Murine Listeriose als Modell für die zelluläre Infektabwehr..... | 24 |
| 2.3.1.6 Vorteile von <i>Listeria monocytogenes</i> als Impfstoffträger | 27 |
| 2.3.1.6.1 <i>Listeria</i> -spezifische Plasmide, welche die Übertragung von heterologen Proteinen ermöglichen..... | 27 |
| 2.3.1.7 Der <i>Lm</i> -spezifische Bakteriophage A118 | 31 |
| 2.4 Ziel dieser Arbeit | 32 |
| Material | 33 |
| 3.1 Bakterienstämme | 33 |
| 3.2 Plasmide | 33 |
| 3.3 Oligonukleotide | 34 |
| 3.4 Eukaryotische Zelltypen | 35 |
| 3.5 Versuchstiere | 36 |
| 3.6 Geräte | 37 |
| 3.7 Verbrauchsmaterialien | 38 |
| 3.8 Chemikalien | 38 |
| 3.8.1 Spezielle Chemikalien für zellbiologische Versuche..... | 38 |
| 3.9 Enzyme | 38 |
| 3.10 Molekulargewichtsstandard | 39 |
| 3.11 Proteine und Peptide | 39 |
| 3.12 Antikörper | 39 |
| 3.13 Zellkultur-Medien | 40 |
| 3.14 Kits | 40 |
| 3.15 Verwendete Software | 41 |
| Methoden | 42 |
| 4.1 Molekulargenetische Methoden | 42 |
| 4.1.1 Übersicht über die Herstellung rekombinanter Vektoren | 42 |
| 4.1.1.1 Isolation von genomischer DNA aus Bakterien | 42 |
| 4.1.1.2 Herstellung von Schnelllysats aus <i>E. coli</i> oder <i>Lm</i> | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.1.3 Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i> | 43 |
| 4.1.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 43 |
| 4.1.1.5 Touchdown-PCR..... | 44 |
| 4.1.1.6 Rekombinante PCR..... | 44 |
| 4.1.1.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren..... | 45 |
| 4.1.1.8 Agarose-Gel-Elektrophorese..... | 46 |
| 4.1.1.9 Reinigung von DNA aus PCR Ansätzen oder Präparation von DNA aus Agarose- Gelen..... | 47 |
| 4.1.1.10 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen..... | 47 |
| 4.1.1.11 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA..... | 48 |
| 4.1.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor..... | 48 |
| 4.1.1.13 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen..... | 49 |
| 4.1.1.13.1 Herstellung von elektrokompenten <i>E. coli</i> Zellen..... | 49 |
| 4.1.1.13.2 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Elektroporation..... | 49 |
| 4.1.1.14 Sequenzierung von DNA..... | 50 |
| 4.1.2 Arbeiten mit RNA..... | 50 |
| 4.1.2.1 RNA-Isolierung aus <i>Lm</i> spp..... | 50 |
| 4.1.2.2 DNase Behandlung von RNA..... | 51 |
| 4.1.2.3 Slot-Blot..... | 51 |
| 4.2 Mikrobiologische Arbeiten..... | 52 |
| 4.2.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Listeria monocytogenes</i> | 52 |
| 4.2.2 Herstellung von Glycerinstocks..... | 53 |
| 4.2.3 Transformation von <i>Listeria monocytogenes</i> | 53 |
| 4.2.3.1 Herstellung von elektrokompenten <i>Lm</i> -Zellen..... | 53 |
| 4.2.3.2 Transformation von <i>Lm</i> Zellen durch Elektroporation..... | 54 |
| 4.2.5 Austausch von Plasmiden in der Deletionsmutante <i>Lm</i> $\Delta trpS/ptrpS$ | 54 |
| 4.2.6 Wachstumsverhalten von <i>Lm</i> | 54 |
| 4.2.7 Herstellung von Infektionsaliquots..... | 55 |
| 4.2.7 Konstruktion von <i>Lm</i> Deletionsmutanten..... | 55 |
| 4.3 Proteinanalytische Methoden..... | 56 |
| 4.3.1 Präparation von bakteriellen Proteinen für SDS-PAGE..... | 56 |
| 4.3.2 Präparation von eukaryotischen Proteinen für SDS-PAGE..... | 57 |
| 4.3.3 Immunpräzipitation..... | 58 |
| 4.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford..... | 59 |
| 4.3.5 Western Blot..... | 59 |
| 4.3.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 59 |
| 4.3.5.2 Proteinanalyse im Western Blot..... | 60 |
| 4.3.5.2.1 Transfer von Proteinen auf eine Nylonmembran (Blotten)..... | 60 |
| 4.3.5.2.2 Immundetektion von Proteinen..... | 61 |
| 4.4 Arbeiten mit Zellkulturen..... | 62 |
| 4.4.1 Routinemethoden zur allgemeinen Handhabung und Subkultivierung von Zellen..... | 62 |
| 4.4.1.1 Mediumwechsel bei Monolayerkulturen..... | 63 |
| 4.4.1.2 Subkultivierung von Monolayerkulturen..... | 63 |
| 4.4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen..... | 63 |
| 4.4.1.4 Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Färbung..... | 64 |
| 4.4.2 Spezielle Arbeiten mit den Zellen..... | 64 |
| 4.4.2.1 Infektionen mit <i>Lm</i> | 64 |
| 4.4.2.1.2 Adhärenztest..... | 66 |
| 4.4.2.1.3 Invasionstest und Replikationsstudien..... | 66 |
| 4.4.2.2 Transfektion von Zellen..... | 67 |
| 4.4.2.3 Färben von Zellen mit Giemsa..... | 67 |
| 4.4.2.4 Durchflußzytometrie von EGFP-exprimierenden Zellen..... | 67 |
| 4.5 <i>In vivo</i> und immunologische Methoden..... | 68 |
| 4.5.1 Infektion von Mäusen mit Listerien..... | 68 |
| 4.5.1.1 Präparation der Listerien aus Milz und Leber..... | 68 |

| | |
|---|------------|
| 4.5.2 Mausezucht und Typisierung von TCR transgenen Mäusen..... | 69 |
| 4.5.2.1 Mausezucht..... | 69 |
| 4.5.2.1.1 OT-I und OT-II Mäuse..... | 69 |
| 4.5.2.2 Schwanzblutentnahme und Typisierung..... | 69 |
| 4.5.3 Herstellung von Einzelzellsuspension aus Milzen..... | 71 |
| 4.5.4 Adoptives-Transfer-Experiment..... | 72 |
| 4.5.5 Färbung der Milzzellen..... | 73 |
| 4.5.6 Immunisierung von Mäusen..... | 74 |
| 4.5.6.1 Blutentnahme der Maus..... | 74 |
| 4.5.6.2 Isolierung von T-Lymphozyten..... | 74 |
| 4.5.6.3 Enzym Assays..... | 75 |
| 4.5.6.3.1 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)..... | 75 |
| 4.5.6.3.2 Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISPOT)..... | 76 |
| 4.6 Spezielle Methoden..... | 78 |
| 4.6.1 Immunofluoreszenzanalyse..... | 78 |
| 4.6.2 MTT-Test..... | 78 |
| 4.7 Statistik..... | 79 |
| Ergebnisse..... | 80 |
| 5.1 Anwendungen verschiedener Vakzinierungsstrategien unter der Verwendung von virulenzattenuierten <i>Listeria monocytogenes</i> Stämmen..... | 80 |
| 5.1.1 Ovalbumin als Modellantigen..... | 81 |
| 5.1.1.1 Konstruktion der Ovalbumin-Expressionsplasmide für die drei Vakzinierungsstrategien..... | 81 |
| 5.1.1.2 Charakterisierung der einzelnen Ovalbumin Expressionsplasmide..... | 84 |
| 5.1.1.2.1 Nachweis der Expression des Ovalbumins..... | 84 |
| 5.1.1.2.2 Wachstumsverhalten der <i>Lm</i> Trägerstämme im Vollmedium BHI..... | 88 |
| 5.1.1.2.3 Wachstumsverhalten der Trägerstämme in P388.D1 Makrophagen..... | 89 |
| 5.1.1.2.4 Intrazelluläres Verhalten der Trägerstämme nach Infektion der Wirtszelle.... | 90 |
| 5.1.1.2.5 Virulenzattenuation des autolysierenden Stammes <i>Lm</i> $\Delta trpS/pSP118$ <i>in vivo</i> | 92 |
| 5.1.1.3 Nachweis einer primären Aktivierung von OVA-spezifischen T-Lymphozyten durch den Vakzineträger <i>Lm</i> | 95 |
| 5.1.1.3.1 Primäre Aktivierung von OVA-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen..... | 96 |
| 5.1.1.3.2 Primäre Aktivierung von OVA-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen..... | 100 |
| 5.1.1.4 <i>In vivo</i> Versuche zum Nachweis einer T-Gedächtniszellantwort nach Immunisierung durch die drei Trägerstämme..... | 101 |
| 5.1.1.5. Effizienz weiterer virulenzattenuierter <i>Lm</i> Stämme als Überträger von Ovalbumin <i>in vivo</i> | 103 |
| 5.1.1.5.1 Der Stamm <i>Lm</i> $\Delta trpS hlyW491A$ als Überträger von Ovalbumin..... | 104 |
| 5.1.1.5.2 <i>Lm</i> $\Delta(trpS aroA aroB)$ als Überträger von Ovalbumin..... | 105 |
| 5.1.2 IE1 des murinen Zytomegalievirus als Modellantigen..... | 108 |
| 5.1.2.1 Konstruktion der IE1-Expressionsplasmide für die drei Vakzinierungsstrategien.... | 108 |
| 5.1.2.2 Charakterisierung der IE1-Expressionsplasmide..... | 111 |
| 5.1.2.2.1 Nachweis der Expression..... | 111 |
| 5.2 Der Einfluss der kompartiment-spezifischen und bakteriellen Expression des Antigens auf die primäre Aktivierung von T-Lymphozyten..... | 113 |
| 5.2.1 Konstruktion von unterschiedlichen bakteriellen Expressionskassetten für Ovalbumin..... | 114 |
| 5.2.2 Nachweis der OVA-Expression und Lokalisation in den rekombinanten <i>Lm</i> Stämmen... | 116 |
| 5.2.3 Einfluss der bakteriellen Lokalisation des OVAs auf die Vitalität und Virulenz der Trägerstämme..... | 117 |
| 5.2.4 Primäre Aktivierung von OVA-spezifischen T-Lymphozyten..... | 120 |

| | |
|---|-----|
| 5.3 Konstruktion neuer virulenzattenuierter <i>Lm</i> Stämme als Vakzineträger | 123 |
| 5.3.1 Konstruktion der <i>Lm</i> Deletionsmutanten $\Delta(trpS\ inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS\ inlAB)/pflotrps$, $\Delta(trpS\ actA\ inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB\ actA)/pflotrps$ | 124 |
| 5.3.2 Einfluss der Deletion der Gene <i>actA</i> , <i>inlA</i> und <i>inlB</i> auf das Wachstums- verhalten..... | 126 |
| 5.3.2.1 Das extrazelluläre Wachstum der Deletionsmutanten in BHI | 126 |
| 5.3.2.1 Das Wachstum der Deletionsmutanten <i>in vivo</i> | 127 |
| 5.3.3 Charakterisierung der Deletionsmutante <i>Lm</i> $\Delta(trpS\ inlAB)$ als Vakzineträger..... | 128 |
| 5.4 Entwicklung alternativer autolysierender <i>Lm</i> Stämme für die Baktinfektion | 132 |
| 5.4.1 Konstruktion der alternativen autolysierenden <i>Lm</i> Stämme..... | 133 |
| 5.4.2 Charakterisierung der alternativen autolysierenden <i>Lm</i> Stämme..... | 135 |
| 5.4.2.1 Extrazelluläres Wachstum der Stämme..... | 135 |
| 5.4.2.1 Wachstum und intrazelluläres Verhalten der neuen auto-lyisierenden Stämme in der CACO-2 Zelllinie..... | 135 |
| 5.4.2.2 Untersuchungen zum Gentransfer in verschiedene Zelllinien mit den alternativen autolysierenden <i>Lm</i> Stämmen | 141 |
| 5.4.2.3 Intravenöse Infektion von C57BL/6 Mäusen mit den autolysierenden Gentransferstämmen $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ | 143 |
| Diskussion | 145 |
| 6.1 Die Effizienz der Übertragung von DNA, mRNA oder Proteinen durch die jeweiligen virulenzattenuierten <i>Lm</i> $\Delta trpS$ Stämme in die Maus | 146 |
| 6.2 Die Charakterisierung der unterschiedlichen Erfolge der drei Vakzinierungsstrategien | 148 |
| 6.2.1 Die Übertragung des Proteins..... | 150 |
| 6.2.2 Die Übertragung der Plasmid-DNA und der RNA | 152 |
| 6.3 Die Rolle des Phagenlysins für die drei Vakzinierungsstrategien..... | 157 |
| 6.4 Die Charakterisierung der <i>Lm</i> $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ -Mutante als neuer Impfstoffträger..... | 159 |
| 6.5 Die kompartiment-spezifische und bakterielle Expression des Antigens beeinflusst die Effizienz der primären Aktivierung von CD4 T-Lymphozyten aber nicht von CD8 T-Lymphozyten | 160 |
| 6.6 Die Eignung neuer virulenzattenuierter Listerien als Impfstoffträger | 166 |
| 6.6.1 Die <i>Lm</i> $\Delta(trpS\ inlAB)$ -Mutante als Impfstoffträger | 168 |
| 6.7 Die Rolle des Holins und der Kombination aus Holin und Phagenlysin für die intrazelluläre Freisetzung der Plasmid-DNA | 169 |
| Literaturverzeichnis | 173 |
| Abkürzungsverzeichnis | 193 |
| Anhang | 195 |
| Curriculum vitae | 206 |
| Publikationen | 207 |

KAPITEL 1

Zusammenfassung

Virulenzattenuierte Stämme des Gram-positiven Pathogens *Listeria monocytogenes* (*Lm*) stellen optimale Kandidaten als Träger für heterologe Proteinantigene in die Maus dar. *Lm* repliziert nach Befreiung aus dem primären phagosomalen Kompartiment sehr effizient und schnell im Zytosol sehr vieler nicht-phagozytischer Wirtszellen als auch in professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC). Diese Fähigkeit in relevante immunologische APCs einzudringen und zu replizieren, erlaubt die zielgerichtete Übertragung heterologer Antigene in die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Präsentationswege, um so eine effektive zelluläre Immunität zu etablieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die *in vivo* Effizienzen der Aktivierung von antigen-spezifischen CD8⁺ and CD4⁺ T-Zellen miteinander verglichen, sobald das plasmidkodierte Proteinantigen Ovalbumin (OVA) in Form von bakteriell exprimierten und exportierten Proteinen, von cDNA oder mRNA durch die jeweiligen virulenzattenuierten *Lm* $\Delta trpS$ Stämme in das Zytosol von antigenpräsentierenden Zellen freigesetzt wurde. Die Freisetzung wurde durch ein *Listeria*-spezifisches Phagenlysin, welches von den Bakterien vorwiegend im Zytosol der Wirtszelle exprimiert wird, unterstützt. Die Übertragung dieser unterschiedlichen biologisch-aktiven Moleküle durch die autolysierenden Listerien führte im Falle des Proteins und der mRNA erfolgreich zu einer MHC-Klasse-I-Präsentation eines Ovalbumin-Peptides (SIINFEKL), welche letztendlich eine adaptive zelluläre Immunität unter Beteiligung von T-Gedächtniszellen induzierte. Dabei stellte sich die Übertragung des Proteins durch *Lm* als die effizienteste Strategie im Induzieren einer zellulären adaptiven Immunantwort mit gegen Ovalbumin gerichteten CD8 und CD4 T-Gedächtniszellen heraus. Autolysierende Listerien, welche die plasmidkodierende OVA-DNA übertrugen, lösten dagegen keine OVA-spezifische T-Zellantwort aus.

Da sich der Trägerstamm *Lm* $\Delta trpS$ aufgrund der Autolysiskassette zwar als virulenzattenuiert herausgestellt hatte, jedoch bei höher Applikationsdosis dieses Stammes es nur zu einer unvollständigen Lysis kam, wurden die jeweiligen Effizienzen weiterer noch stärker attenuierter autolysierender *Lm* Stämme als Überträger des Ovalbumins (*Lm* Mutanten $\Delta trpS$ *hlyW491A* und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$) bestimmt. Beide ermöglichten die OVA-Präsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle mit nachfolgender klonaler Expansion spezifischer CD8⁺ T-Zellen in vergleichbaren signifikanten Werten zum WT Stamm $\Delta trpS$. Ferner wurde zum ersten Mal eine signifikante Präsentation des OVAs über MHC-Klasse-I-Moleküle durch die autolysierende Mutante $\Delta trpS$ *hlyW491A*, welche die plasmidkodierende DNA freisetzte, nachgewiesen. Die autolysierende *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ Mutante in hoher CFU (5×10^7) stellte sich dabei als ein sehr vielversprechender Träger des heterologen Proteinantigens heraus, da sie im Gegensatz zum autolysierenden Stamm *Lm* $\Delta trpS$ eine sehr geringe Leberschädigung hervorrief.

In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass durch Freisetzung von OVA Antigenen in das Zytosol oder ins Phagosom von APCs, welche von den jeweiligen *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ Stämmen als exportiertes, zellwandverankertes oder intrazellulär verbleibendes Protein exprimiert wurden, vergleichbare Häufigkeiten an proliferierten OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen induziert werden konnten. Es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in der Aktivierung antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen durch diese *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ OVA-Trägerstämme. Die Strategie der Übertragung exportierter Proteine ins Phagosom oder ins Zytosol antigenpräsentierender Zellen war die wirkungsvollste, um gleichzeitig effiziente MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-restringierte Antigenpräsentationen *in vivo* zu induzieren.

Um weitere virulenzattenuierte Trägerstämme zu konstruieren wurden die Virulenzgene *actA*, *inIA* und *inIB* im Chromosom von *Lm* $\Delta trpS$ deletiert. Diese daraus resultierenden Mutanten $\Delta(trpS\ inIB)/pflotrpS$, $\Delta(trpS\ inIAB)/pflotrpS$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inIB)/pflotrpS$ und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inIB\ actA)/pflotrpS$ erwiesen sich als sehr attenuiert im Modell der murinen Listeriose. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass sich die $\Delta(trpS\ inIAB)$ -Mutante als effizienter Überträger von EGFP-Expressionsplasmiden *in vitro* wie auch als Impfstoffträger von plasmidkodierten heterologen Proteinantigenen *in vivo*, eignet.

Es wurden alternative plasmidkodierende Lysiskassetten für die Freisetzung von DNA-Vakzinen (Baktinfektion) aus den Bakterien konstruiert, die alle aus Lyseproteinen eines *Listeria*-spezifischen Phagens und einem vorangestellten zytosolischen listeriellen Promotor bestehen. Diese wurden in ihrer Effizienz mit der ursprünglich eingesetzten Lysiskassette $P_{actA}\text{-}ply118$ verglichen. Dabei wurde beobachtet, dass zwei von den vier neukonstruierten Lysiskassetten in einige Zelllinien vergleichbare Baktinfektionsraten erzielten. Jedoch ist die ursprüngliche Phagenlysin-Kassette $P_{actA}\text{-}ply118$ für die Übertragung von Plasmid-DNA in das Zytosol von Wirtszellen die wirksamste, da diese *in vivo* zu einer besonders hohen Attenuation der Bakterien führte.

Summary

Virulence-attenuated strains of the Gram positive pathogen *Listeria monocytogenes* (*Lm*) are optimal candidates for the delivery of heterologous antigens into mammalian hosts. *Lm* escapes the phagosome, replicates efficiently within the cytosol of many host cells including appropriate cells of the immune system like macrophages and dendritic cells (antigen presenting cells, APCs). These natural biological properties of *Lm* to enter and replicate in relevant immunological APCs allow the targeted delivery of heterologous antigens into the antigen-processing pathway of MHC class I and MHC class II molecules leading to a strong cellular immunity.

In this work, the *in vivo* efficiencies of activation of antigen-specific CD8 and CD4 T cells were compared when the plasmid-encoded protein antigen ovalbumin was secreted by the bacteria as a protein or delivered as cDNA or as mRNA. Delivery was supported also by a specific endolysin produced by the bacteria. *Listeriae* harbouring this transcriptional unit undergo lysis when they reach the cytosol. In the case of OVA as protein or as mRNA, delivery of these different biological active molecules by autolysing *Listeria* resulted in significant OVA peptide (SIINFEKL) presentation in the context of MHC class I molecules, which also induced an adaptive cellular immunity with memory T cells. Secretion of OVA by the carrier bacteria yielded the strongest immune response involving OVA-specific memory CD8 and CD4 T cells. In contrast, infection with autolysing *Listeria* delivering OVA-encoded DNA failed to generate OVA-specific T cells.

Due to its harbouring of the autolysing cassette, carrier strain *Lm* $\Delta trpS$ was virulence-attenuated, but infection with 5×10^7 bacteria of this strain resulted in a partial lysis. Therefore investigation of other attenuated and also autolysing strains (*Lm* mutants $\Delta trpS hlyW491A$ and $\Delta(trpS aroA aroB)$) was necessary. Both these strains facilitated OVA presentation via MHC-class-I molecules resulting in clonal expansion of specific CD8⁺ T cells in comparable frequencies as the wild-type strain. Furthermore, autolysing *Lm* $\Delta trpS hlyW491A$ delivering OVA-encoded DNA led to specific presentation of OVA in the context of MHC class I molecules. Additionally, autolysing *Lm* $\Delta(trpS aroA aroB)$ strain with high infection dose (5×10^7) is a promising carrier for heterologous protein antigens because this mutant exhibited only marginal liver toxicity in contrast to the strain *Lm* $\Delta trpS$.

In this regard, comparable frequencies of proliferated OVA-specific CD8⁺ T cells were induced through the delivery of OVA antigens into phagosome or cytosol of APCs that were expressed as secreted proteins, as anchored-proteins or as intracellular proteins by the respective carrier *Lm* strains $\Delta(trpS aroA aroB)$. Activation of antigen-specific CD4⁺ T cells by these OVA-carrier *Lm* $\Delta(trpS aroA aroB)$ was different compared to activation of antigen-specific CD8⁺ T cells. Secretion

of OVA by the carrier bacteria yielded the strongest activation of both MHC-class I and II restricted antigen presentation *in vivo*.

In order to generate other virulence-attenuated carrier strains, *actA*, *inlA* and *inlB* were deleted in the chromosome of the strain $\Delta trpS$. The resulting strains $\Delta(trpS inlB)/pflotrpS$, $\Delta(trpS inlAB)/pflotrpS$, $\Delta(trpS aroA aroB inlB)/pflotrpS$ und $\Delta(trpS aroA aroB inlB actA)/pflotrpS$ were shown to be highly attenuated in mice. Additionally it was demonstrated, that $\Delta(trpS inlAB)$ strain was very efficient as carrier of EGFP-encoded plasmid *in vitro* and is an optimal candidate for the delivery of plasmid-encoded heterologous antigens into mice.

Different lysis cassettes were tested consisting of *Listeria*-specific phage lysis proteins and an intracellular promoter of *Listeria* for the delivery of DNA vaccines (bactofection). The efficiency of these cassettes was compared to the original cassette (P_{actA} -*ply118*). Two of the four new cassettes achieved comparable bactofection rates in some cell lines as the originally used cassette. However, the *Lm* strain containing the cassette P_{actA} -*ply118* was found to be the most effective due to high attenuation in mice.

2.1 Impfstoffe

Impfstoffe (Vakzine) repräsentieren einen der größten Erfolge der biomedizinischen Forschung [319]. Unter einem Impfstoff versteht man ein biologisch oder gentechnisch hergestelltes Agens, meist bestehend aus einzelnen Protein- oder DNA-Sequenzstücken, abgetöteten oder abgeschwächten Erregern. Dieser Impfstoff dient im Rahmen einer Impfung (Vakzinierung) zur spezifischen Aktivierung des Immunsystems hinsichtlich eines bestimmten Erregers, bzw. einer Erregergruppe [83].

Historisch gesehen wurden schon sehr früh (10. Jahrhundert v. Chr.) erste Impfungen gegen Pocken in Indien und China durchgeführt. Dort wählten Ärzte zur Gewinnung des Impfstoffs Personen mit leichtem Krankheitsverlauf aus und entfernten Krustenstücke der Pocken dieser Infizierten. Die Stücke wurden zu einem Pulver zermahlen und in die Nasenschleimhaut oder Haut der zu impfenden Person eingeführt [83]. Die deklarierte Geburtsstunde der Impfforschung liegt im Jahr 1796. Edward Jenner berichtete über eine Impfung mit Kuhpocken (Vacciniavirus), mit deren Hilfe es zu einem Schutz gegen das humane Pockenvirus (Variolavirus) kam [143]. Erst 70 Jahre nach Jenners Erfolgsmeldung wurden in den Arbeitsgruppen um Louis Pasteur und Robert Koch die ersten rationalen Impfstoffstrategien entwickelt. Louis Pasteur führte zu Jenners Ehren den Begriff der Vakzinierung ein: nicht auf die Impfung mit Vaccinia beschränkt, sondern für alle Arten von Impfungen. 1979 wurden die Pocken von der „World Health Organization“ (WHO) für ausgerottet erklärt [309]. Drei wichtige Tatsachen führten zu diesem Erfolg: die hohe Effizienz des Impfstoffes, die konsequente Impfung der Gesamtbevölkerung (deutsches Zwangsimpfgesetz von 1874) und die Restriktion des Pockenvirus auf dem Menschen [117].

Seit dem Aufkommen von routinemäßigen Impfungen konnte das Auftreten zahlreicher Kinderkrankheiten (auch früher als Volkskrankheiten bezeichnet) wie Polio, Masern, Mumps und Röteln bis zu 100% gesenkt werden. Durch diesen Erfolg gelang es im 20. Jahrhundert entscheidend, die Lebenserwartung zu erhöhen und die Sterberate zu senken [250].

Auf der anderen Seite mangelt es weiterhin an effektiven Impfstoffen gegen viele andere Krankheiten. Zum Beispiel sind von 56 Millionen frühzeitigen Todesfällen weltweit ca. 33 % auf infektiöse und parasitäre Krankheiten wie z. B. Tuberkulose, Ruhr, AIDS, Malaria, SARS und Schlafkrankheit, zurückzuführen [177]. Da es sich bei den meisten Erregern der Infektionskrankheiten um Pathogene handelt, welche intrazellulär leben, gering zytopathisch, langsam replizierend und persistierend sind, können die traditionellen Impfstoffe, welche hauptsächlich über Antikörper einen Impfschutz vermitteln, nicht wirken [319, 250]. Deshalb steigt

der Bedarf an verbesserten und neuen Impfstoffen, die vor allem den zellulären aber auch den humoralen Arm der Immunität aktivieren können [319]. Generell sind Anforderungen, die an einen idealen Impfstoff gestellt werden, bekannt (siehe Tabelle), dennoch gibt es keine allgemein gültigen Strategien zur Entwicklung von Vakzinen [176].

Tabelle 2.1: Eigenschaften einer idealen Vakzine (modifiziert nach [22])

-
- lebenslange Immunität
 - keine bzw. wenig Virulenz
 - Induktion einer spezifischen zellulären und humoralen Immunität
 - effektiv in allen Empfängern
 - keine bzw. nur schwache klinische Reaktionen
 - nur eine einmalige Immunisierung zur Protektion
 - keine Rückmutation zur Virulenz
 - schnelle Induktion einer effektiven Immunantwort
 - praktikabel, kostengünstig, biologisch stabil
-

Die Erfordernisse einer erfolgreichen Impfung hängen immer sowohl von den Eigenschaften des jeweiligen Pathogens, als auch von dem entwickelten Impfstoff selbst ab, um eine erfolgreiche und schützende Immunität zu generieren. Im Allgemeinen hat man mit der Impfung eine Strategie in der Hand, mit der das Immunsystem auf den Angriff von Pathogenen vorbereitet und trainiert wird. Denn der Geschwindigkeit und Variationsfähigkeit des Erregers steht immer die Spezialisierung und Komplexität des Immunsystems des Wirtes gegenüber.

2.2 Überblick über die Mechanismen des Immunschutzes

Die Aufgabe des Immunsystems ist es unter anderem, zum einen vor Infektionen zu schützen, die durch eine Vielzahl unterschiedlicher Pathogene (Bakterien, Viren, Pilze, Helminthen und Protozoen) hervorgerufen werden und zum anderen entartete Zellen (Tumore) unschädlich zu machen. Der Immunschutz wird dabei durch ein komplexes Abwehrsystem vermittelt, das aus vielen verschiedenen Zelltypen besteht, die über direkten Zellkontakt oder lösliche Botenstoffe miteinander kommunizieren und interagieren, indem sie die körpereigenen Substanzen und Strukturen von fremden unterscheiden („Self/Non-Self-Diskriminierung von Antigenen“) [15, 73]. Wird das Antigen als „Non-Self“ erkannt, so basiert eine vollständige Abwehrreaktion gegen die infektiösen Erreger und deren Strategien in den Wirt einzudringen, sich auszubreiten und zu vermehren, auf dem engen Zusammenwirken einer angeborenen unspezifischen („innate immunity“) und einer erworbenen, spezifischen Immunität („adaptive immunity“) (Abb.: 2.1) [141].

95% aller Infektionen werden bereits durch die angeborene Immunität beseitigt [319]. Dieses phylogenetisch ältere System der Immunität besteht aus einer physikalisch-chemischen Barriere und aus einer zellulären Abwehr, welche sofort erste Abwehrformationen gegen eindringende Erreger darstellen [157]. So verhindert zum Beispiel der niedrige pH-Wert der Haut oder des

Magens eine Vermehrung der meisten Mikroorganismen (MOs). Speichel-, Tränenflüssigkeiten und muköse Exsudate waschen Pathogene aus dem Körper und enthalten darüber hinaus lytische Proteine (z.B. Lysozym), die MOs unspezifisch abtöten. Entkommt der Erreger diesen Barrieren und breitet sich im Körper aus, entsteht eine Infektion mit den damit verbundenen Krankheitssymptomen. Die Ausbreitung der Erreger zu verhindern, ist die Aufgabe von chemischen als auch zellulären Mechanismen der angeborenen Infektabwehr [157]. Die zirkulierenden und sesshaften Zellen des angeborenen Immunsystems wie Granulozyten (Eosinophile, Neutrophile, Basophile), mononukleäre Phagozyten (Makrophagen) und natürlichen Killer- (NK-) Zellen erkennen die Erreger und deren produzierte Substanzen an allgemeinen, häufig wiederkehrenden, pathogen-spezifischen Strukturmerkmalen, den sogenannten PAMPs („pathogen associated molecular patterns“). Diese Strukturmerkmale werden über sogenannte konservierte PRR („pattern recognition receptor“), wie beispielweise die 13 Mitglieder der TLR („toll-like receptor“-Familie, erkannt [2]. Die Erkennung löst unterschiedliche Antworten zur Eliminierung der Erreger aus. Solche Effektormechanismen sind Phagozytose und Lyse, Abtötung durch NK-Zellen, Zytokinausschüttung und Komplementaktivierung mit nachfolgender Phagozytose von opsonisierten Partikeln, lokale Entzündung durch chemotaktische Fragmente und Zelltötung durch C5-Konvertase-vermittelte Mechanismen [73]. Durch das Vorhandensein einer großen Anzahl an festem Rezeptorrepertoire bedarf es keiner klonalen Vermehrung der Zellen, und die Immunantwort kann im Falle einer Infektion sehr schnell greifen.

Diese frühen Abwehrsysteme der angeborenen Immunität, die auf gleich bleibenden Reaktionen gegen allgemein vorkommende Merkmale von Krankheitserregern beruhen, können gegen neue Arten von Erregern mit unbekanntem Merkmalen keinen Schutz bieten und nicht zu einem immunologischen Gedächtnis führen [141]. Beides gehört jedoch zu den besonderen Merkmalen der adaptiven Immunität (Abb.: 2.1). Die adaptive Immunität durchläuft dabei einen Lernprozess, der es ermöglicht, Eindringlinge effektiv abzutöten. Sie basiert auf Lymphozyten (B- und T-Zellen), die spezifisch körperfremde Mikroorganismen und Moleküle (Antigene) erkennen und deren selektive Eliminierung induzieren können. Jeder dieser ungeprägten (naiven) Lymphozyten, der nach der Entwicklung im Knochenmark (B-Zellen) bzw. im Thymus (T-Zellen) in die peripheren lymphatischen Organe gelangt, trägt an seiner Oberfläche Antigenrezeptoren einer einzigen Spezifität, die zufällig durch somatische Rekombination aus verschiedenen Gensegmenten zusammengesetzt wurden. Da sich die Rezeptorspezifitäten der einzelnen Lymphozyten voneinander unterscheiden (Variabilität), bildet die Gesamtheit aller im Körper zirkulierenden B- und T-Zellen ein so genanntes Repertoire der Lymphozytenrezeptoren. Dieses Repertoire kann praktisch jedes Antigen erkennen. Jeder Lymphozyt durchläuft dabei eine natürliche Selektion. Nur die Lymphozyten, die auf ein fremdes Antigen treffen, das an seinen Rezeptor in ausreichend hoher Affinität bindet, entweder allein (B-Zellen) oder im Komplex mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes („major histocompatibility complex“, MHC) (T-Zellen) und dadurch zusätzliche stimulierende Signale erfahren, werden aktiviert, um zu proliferieren (klonale Expansion) und zu Effektorzellen zu differenzieren, die anschließend den spezifischen Erreger vernichten [141]. Diese klonale Selektion, die 1959 von Frank Macfarlane Burnet beschrieben wurde, ist das zentrale Prinzip der adaptiven Immunität [141]. B-Zellen differenzieren dabei zu Plasmazellen, welche Antikörper sezernieren (humorale Antworten) und T-Zellen werden zu zytotoxischen T-Zellen (cytotoxic T cells, CTL) oder T-Helferzellen (T_H-Zellen) (zelluläre Antworten).

Die humorale Antwort richtet sich vor allem gegen extrazelluläre Erreger, wohingegen die zelluläre Antwort eher gegen intrazelluläre Erreger vorgeht [145]. Letztendlich differenziert ein Teil der proliferierenden T- und B-Lymphozyten zu Gedächtniszellen [1]. Gedächtniszellen sorgen dafür, dass bei einem erneuten Kontakt mit demselben Antigen eine schnellere und besser angepasste Immunreaktion stattfinden kann. Dieses immunologische Gedächtnis wird als Basis für die Entwicklung aller Vakzine angesehen. Die Immunisierung des Wirtes mit Vakzinen soll die Bildung von antigenspezifischen, schnellwirkenden Gedächtniszellen induzieren, ohne dass es zu einer gefährlichen Ausbreitung des Erregers kommt.

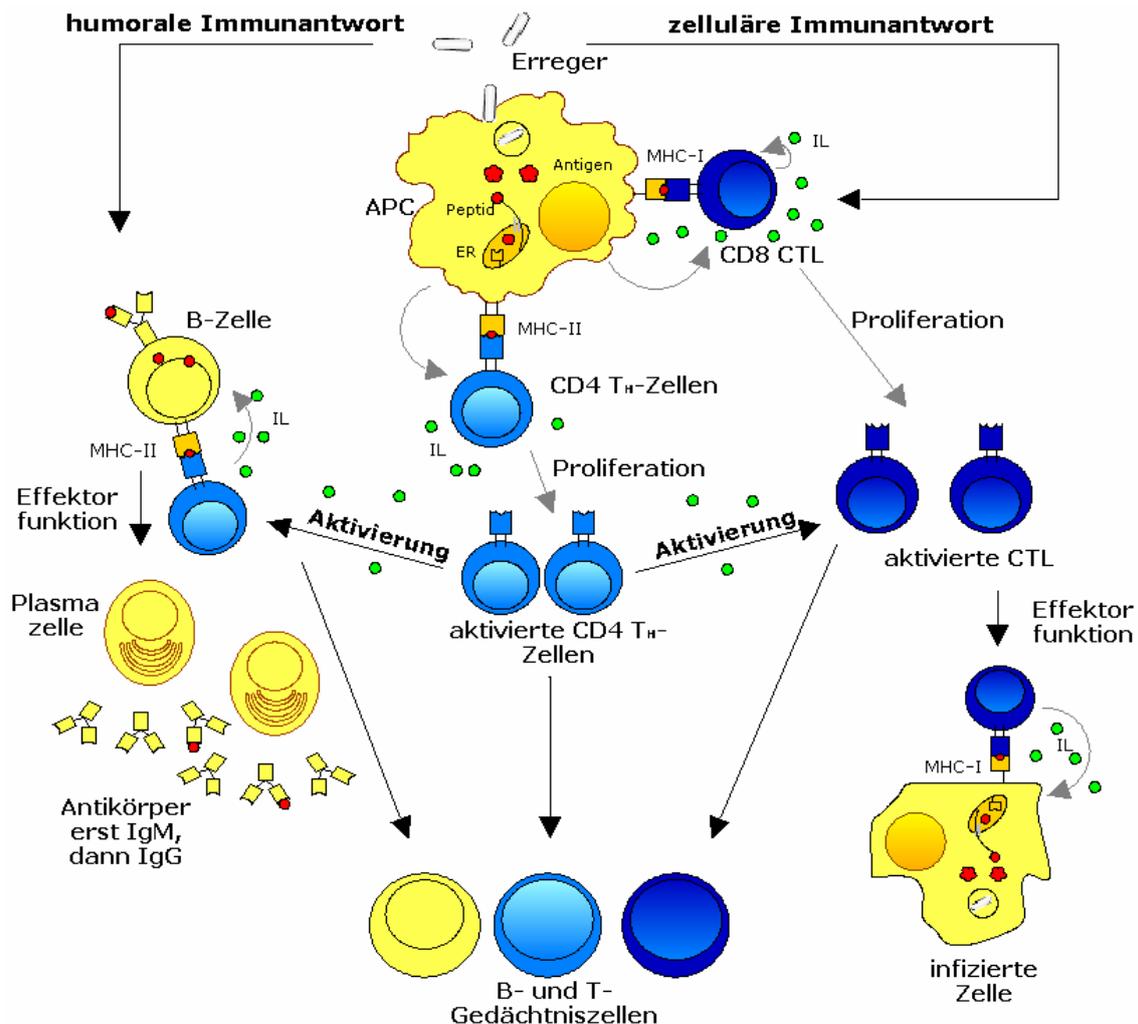


Abb. 2.1: Stark vereinfachtes Schema der adaptiven Immunantwort

2.2.1 Erkennung von Antigenen und deren Präsentation

Der erste Schritt zur Initiierung einer Immunantwort ist die Erkennung von Fremdanitgenen. Mikroorganismen werden bei Eintritt in nicht-lymphatische Gewebe von Makrophagen (M ϕ) oder dendritischen Zellen („dendritic cells“, DCs) an ihren pathogenassoziierten molekularen Mustern durch Bindung an Rezeptoren erkannt. M ϕ und DCs gehören neben B-Zellen zu den antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APCs). Dendritische Zellen werden allgemein als die wichtigsten APCs betrachtet, da sie besonders in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren [137, 183]. Vorläufer-DCs patrouillieren durch das Blut, die Lymphe und Lymphgewebe.

Unreife DCs dagegen sind mit geringer T-Zell-stimulierender Aktivität in den meisten peripheren Geweben, vor allem in der Haut (Langerhans-Zellen) und den Schleimhäuten präsent [13]. Diese unreifen DCs nehmen kontinuierlich Self- und Non-Self-Antigene durch Makropinozytose [260], rezeptorvermittelte Endozytose [77] oder Phagozytose [245] auf. Die aufgenommenen Antigene werden anschließend in proteolytische Peptide prozessiert und auf Moleküle des MHC geladen. Gelangen diese MHC-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche, spricht man von Antigenpräsentation. Die Antigenpräsentation ist allerdings bei unreifen DCs noch sehr ineffizient, da sie im unreifen Zustand auf ihrer Oberfläche nur wenig MHC-Moleküle und kostimulatorische Moleküle haben, die für eine effiziente T-Zellaktivierung benötigt werden [209]. Sie tragen stattdessen Rezeptoren, die vor allem eine effiziente Antigenaufnahme vermitteln, wie den Mannoserezeptor DEC-205 [144] und die Fc γ -Rezeptoren Typ I (CD64) und Typ II (CD32) [80]. Der Reifungsprozeß der DCs wird von „Gefahrensignalen“ [201], die durch unterschiedliche Moleküle wie CD40, TNF-R und IL-1R und u. a. durch Toll-Rezeptoren erkannt werden, ausgelöst. Anschließend führt diese Aktivierung zur Transformation der DCs in effiziente APCs und T-Zellaktivatoren [13]. Dabei geht der Reifungsprozeß mit der Wanderung der DCs aus dem peripheren Gewebe über die afferenten Lymphbahnen in benachbarte Lymphgewebe einher. In den ableitenden Lymphknoten werden reife DCs durch Chemokine in die parakortikalen Bereiche gelenkt, in der sich vorwiegend T-Zellen aufhalten [69]. Hier verlieren sie die Fähigkeit Antigene aufzunehmen, und sind dafür nun verstärkt in der Lage, MHC-Moleküle und kostimulatorische Moleküle zu exprimieren, um vorbei wandernde T-Zellen zu stimulieren.

MHC-Moleküle sind spezialisierte Moleküle, die den T-Zellen Antigene präsentieren. Sie sind membran-gebundene Glykoproteine, die von einer Gruppe von Genen mit der Bezeichnung Haupthisto-kompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“, MHC) kodiert werden. Da mehrere eng gekoppelte, sehr polymorphe Gene die Haupthistokompatibilität festlegen, kommt es innerhalb eines Individuums zu einem bestimmten Spektrum an Peptiden, die gebunden werden können. Deshalb kann das Immunsystem auf eine Vielzahl unterschiedlicher Pathogene antworten. MHC-Moleküle lassen sich in zwei Klassen unterteilen, die unterschiedlich auf verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf der Oberfläche fast aller kernhaltigen Wirbeltierzellen exprimiert und präsentieren hauptsächlich Peptidfragmente (8-11 AS) intrazellulärer synthetisierter und degradierter Proteine. Die Proteolyse der Proteine findet im Proteasom des Zytosol statt. Nach Proteolyse werden die Peptide TAP-1/TAP-2 („transporters associated with antigen processing-1 and -2“)-abhängig ins endoplasmatische Reticulum transportiert, wo anschließend der Einbau ins MHC-Klasse-I-Molekül stattfindet (Abb.: 2.2) [313, 251]. MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer α -Kette, die im MHC-Lokus kodiert ist und einer kleineren, nicht kovalent assoziierten Kette, dem β 2-Mikroglobulin, die nicht im MHC kodiert ist. Dagegen bestehen die MHC-Klasse-II-Moleküle aus zwei im MHC-kodierten Ketten, der α - und der β -Kette [145]. Diese Moleküle werden konstitutiv nur von spezialisierten APCs auf der Oberfläche exprimiert und präsentieren Peptidfragmente (10-18 AS) von extrazellulären Antigenen, die durch Phagozytose aufgenommen wurden. Daher findet die Proteolyse dieser Proteine hauptsächlich im Lysosom statt, wo auch die Einbindung ins MHC-Klasse-II-Molekül geschieht (Abb.: 2.2) [303]. Die MHC-Moleküle beider Klassen stimmen in wichtigen Strukturmerkmalen, welche die Bindung des Peptids betrifft, überein. Die beiden äußeren extrazellulären Domänen der Moleküle bilden einen langen Spalt, in den ein einzelnes Peptidfragment bei der Synthese und beim Zusammenbau der

MHC-Moleküle innerhalb der Zelle gebunden wird. Sowohl für MHC-Klasse-I- als auch für MHC-Klasse-II-Moleküle gilt, dass die gebundenen Peptide einen integralen Bestandteil ihrer Struktur darstellen, ohne den sie instabil sind. Nach Einbau werden die Peptid-MHC-Komplexe über einen vesikulären Transport an die Zelloberfläche gebracht, wo sie die Funktion der Antigenpräsentation ausführen [141].

DCs können auch ihr exogenes Antigen über MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren. Dieser Mechanismus ist als „cross presentation“ beschrieben [166, 33]. Bisher sind zwei Mechanismen bekannt, wie das internalisierte extrazelluläre Antigen von den APC prozessiert wird. Entweder wird das Antigen aus dem Phagosom ins Zytosol transferiert, wo es Proteasom-abhängig prozessiert, TAP-1/TAP-2-abhängig ins ER transportiert und schließlich an MHC-Klasse-I-Moleküle im ER oder Phagosom gebunden wird („Zytosol-abhängiger Weg“) [166]. Oder prozessierte Peptide werden auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen, die aus degradierten Proteinen in Vakuolen entstanden sind („Zytosol-unabhängiger Weg“) [146].

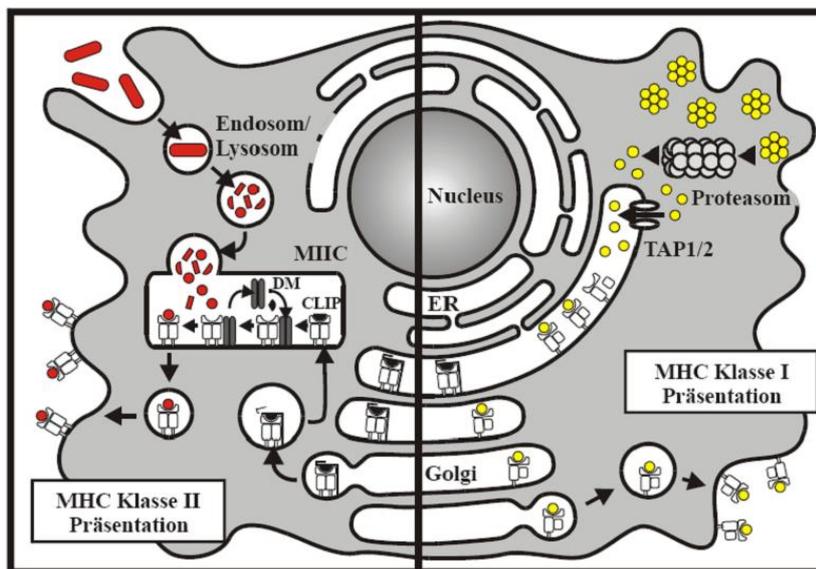


Abb. 2.2: Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Moleküle (entnommen aus [97])

2.2.2 Die zelluläre Immunantwort (T-Lymphozyten)

Nachdem die T-Zellen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entstanden sind, wandern sie als unreife T-Zellen in den Thymus ein, wo sie weitere Reifungsprozesse durchlaufen, bevor sie anschließend als reife T-Zellen in die Peripherie wandern. Hier zirkulieren sie zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen, wie Milz, Lymphknoten und Peyerschen Plaques hin und her [195, 244], wo sie auf APCs treffen, die ihnen Antigene präsentieren. Die T-Lymphozyten erkennen mit ihrem klonalen T-Zellrezeptor (T cell receptors, TCRs) ausschließlich Self- and Non-Self-Antigene im Komplex mit MHC-Molekülen [24]. Der TCR auf der Mehrheit der T-Zellen ist ein Heterodimer aus je einer hochvariablen α - und β -Polypeptidkette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die restlichen T-Zellen besitzen dagegen einen TCR aus einer γ - und δ -Untereinheit. Diese γ/δ -T-Zellen haben andere Eigenschaften und Funktionen als die α/β -T-Lymphozyten [26]. Des Weiteren sind die α - und β -Polypeptidketten im Komplex mit den CD3-Heterodimeren und dem CD3-Homodimer in die

Zellmembran eingelagert. Der α/β -TCR erkennt das Antigen, wohingegen die sechs CD3-Ketten das Signal der Antigenbindung ins Innere der Zelle weiterleiten.

Die α/β -T-Lymphozyten werden anhand membranständiger Glykoproteine in zwei Klassen unterteilt: die CD4 und CD8 T-Zellen, da sie nach ihrer Entwicklung im Thymus nur einen der beiden Korezeptoren (CD4 oder CD8) exprimieren.

1974 wurde von Zinkernagel und Doherty nachgewiesen, daß CD8 T-Zellen virales Antigen nur erkennen, wenn es auf syngenen MHC-I-Molekülen präsentiert wird [320]. Kurz zuvor berichtete die Gruppen um Rosenthal und Shevach, dass CD4 T-Zellen nur aktiviert werden, wenn das Antigen auf MHC-Klasse-II-Molekülen desselben Haplotyps präsentiert wird [258]. Demnach erkennt eine T-Zelle durch ihren TCR ein Peptid nur, wenn es an ein körpereigenes MHC-Molekül gebunden ist. Dieses Prinzip wird MHC-restringierte Antigenerkennung oder MHC-Restriktion genannt. Deshalb erkennen TCR der CD8 T-Zellen, die MHC-Klasse-I-restringiert sind, Peptide nur im Komplex mit MHC-I-Molekülen, wohingegen die TCRs der CD4 T-Zellen ausschließlich Peptide gebunden an MHC-Klasse-II Moleküle erkennen.

Findet eine spezifische Erkennung des Antigens über den TCR statt, so kommt es zur Aktivierung von mehreren kostimulierenden Molekülen, die Signale ins Innere der Zelle weiterleiten. Das am besten charakterisierte kostimulierende Molekül ist CD28. Diese Molekül bindet an seine Liganden der B7-Familie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) und bewirkt gemeinsam mit der TCR-Bindung eine erhöhte Produktion des Botenstoffes IL-2., welche die klonale Expansion der T-Lymphozyten erst ermöglicht [56]. Andere kostimulierende Signale werden z. B. über das CD40, CD40-Liganden-System vermittelt. Bindet eine T-Zelle über seinen TCR an einen Peptid-MHC-Komplex in Abwesenheit von Kostimulatoren, so führt dies zur Apoptose oder Anergie der T-Zelle. Anergische T-Zellen entwickeln sich nicht mehr zu Effektorzellen, wenn sie ein weiteres Mal auf dasselbe Antigen treffen. Auf diese Weise wird verhindert, dass autoreaktive T-Zellen gesundes körpereigenes Gewebe angreifen.

Nach der Aktivierung durch ein Doppelsignal bestehend aus Bindung und Kostimulation geht die T-Zelle aus der G0 in die G1 Phase des Zellzyklus über, die sich durch Wachstum der Zelle und die Expression aktivierungsinduzierter Oberflächenmoleküle äußert. Einige Beispiele solcher Oberflächenmoleküle sind CD69, CD44, CD154(CD40L), CD25 und CD134. CD44 zum Beispiel wird von T-Zellen nach Aktivierung sehr stark exprimiert [61], wohingegen die Expression des Oberflächenmoleküls CD62L nach Aktivierung abnimmt [221]. Mit Hilfe solcher Oberflächenmoleküle kann der Aktivierungszustand einer T-Zelle beschrieben werden.

Die aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen üben unterschiedliche Effektorfunktionen aus. Diese sind nachfolgend für die zwei Klassen der T-Zellen beschrieben.

2.2.2.1 CD4 T-Zellen

Aktivierte T-Zellen, welche das CD4 Oberflächenprotein exprimieren, werden T-Helferzellen (T_H) genannt. Damit wird ihre wichtigste Funktion, die Kooperation mit B-Zellen hervorgehoben. Diese Funktion verwirklichen T_H-Zellen, nachdem sie in die in den T-Zellregionen der sekundären lymphatischen Organe lokalisierten B-zellreichen Follikel eingewandert sind [141].

Anhand von Überständen einiger T_H-Zellen wurde herausgefunden, dass viele Zytokine nicht zufällig verteilt, sondern in bestimmten Muster gemeinsam sezerniert werden. Deshalb werden T_H-Zellen in zwei Subpopulationen unterteilt: T_H1- und T_H2-Zellen [215]. T_H1-Zellen produzieren hauptsächlich

IFN- γ , TNF- β und IL-2. Diese Zytokine spielen eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene, wie Viren und einigen intrazellulären Bakterien, wie z.B. *Listeria monocytogenes* (*Lm*) [121]. Außerdem verhilft die Ausschüttung dieser Zytokine zur erhöhten Phagozytentätigkeit und Aktivierung von Makrophagen, Bildung von komplementbindenden, opsonisierenden Antikörpern und zu zytotoxischen T-Zell-Antworten. IL-12, welches von M \emptyset oder B-Zellen produziert wird, fungiert dabei als wichtiger Förderer in der frühen T-Zellaktivierung der T_H1-Zellen und gleichzeitig hemmt es T_H2-Zellen. IL-4 und IL6 dagegen fördern die T_H2-Antwort und hemmen die T_H1-Zellen [141].

T_H2-Zellen exprimieren vor allem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13, was vorwiegend zur Aktivierung von Eosinophilen und Mastzellen, aber auch von B-Zellen führt. Wurm- und viele andere Parasitenerkrankungen führen zur T_H2 Zellantwort. Aber auch Allergiker und Atoptiker leiden unter einer übermäßigen pathologischen T_H2-Antwortbereitschaft [141].

Die sezernierten Zytokine der jeweiligen Subpopulation haben auch einen Einfluß auf den produzierten Antikörpertyp der B-Zellen. Die Zytokine der T_H1-Zellen begünstigen die Produktion der Ig-Isotypen IgG2a und IgG3, während eine T_H2-Antwort eher zur Produktion von IgG1 und IgE führt [62].

Eine andere wichtige Untergruppe der CD4-T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen, die autoreaktive T-Zellen supprimieren und antigenspezifische Immunreaktionen kontrollieren [8].

2.2.2.2 CD8 T-Zellen

Eine wichtige biologische Bedeutung reifer CD8 T-Zellen („cytotoxic t lymphocytes“, CTL) ist die zytotoxische Eliminierung von infizierten oder entarteten Zellen. Wie schon erwähnt erkennen sie endogene Peptide, die von der Zelle selbst oder von intrazellulären Erregern in Zellen synthetisiert wurden, immer in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen. CD4 T_H-Zellen sind für die Induktion von zytotoxischen CD8 T-Zellen oft nicht oder nur auf indirekte Weise nötig. Mehrere Studien, vor allem mit dem intrazellulären Bakterium *Lm* konnten demonstrieren, dass eine vorübergehende Interaktion (min. 2 h) einer naiven CD8 T-Zelle mit einer APC ausreicht, den kompletten linearen Entwicklungsweg, d.h. Expansion, Differenzierung, Kontraktion und Bildung von Gedächtniszellen, zu induzieren [12]. Die Aktivierung einer CD4 T-Zelle benötigt hingegen einen längeren Kontakt zur APC (min. 6 h), führt aber ebenso zu einem linearen Entwicklungsweg [98].

Aktivierte CTL-Zellen können die infizierte Zellen sofort durch Ausschüttung zytotoxischer Effektorproteine (Perforin und Granzyme) oder Fas-vermittelte Mechanismen töten, ohne dass dazu eine weitere Kostimulation erforderlich wäre. Oder sie können über Interleukinfreisetzung (vor allem IFN- γ), genauso wie T_H1-Zellen, nichtzytotoxische Effektorfunktionen vermitteln. Nach der Ausschüttung von IFN- γ durch diese CTLs wird z. B die virale Replikation gehemmt, die Expression von MHC-Klasse-I-Moleküle wird verstärkt exprimiert. Ebenso werden wie nach TNF- α - und TNF- β -Ausschüttung Makrophagen aktiviert. TNF- α und TNF- β können außerdem durch Interaktion mit TNFR-I bei der Tötung einiger Zielzellen zusammenwirken [63].

2.2.3 Die humorale Immunantwort (B-Zellen und Antikörper)

Weitere Lymphozyten, die sich an der spezifischen Bekämpfung der Erreger beteiligen, sind die B-Zellen. Diese sind für die humorale Antwort der adaptiven Immunität verantwortlich. B-Zellen

entstehen ebenfalls aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Im Gegensatz zu T-Zellen erkennen B-Zellen das Antigen direkt über ihren B-Zellrezeptor („B cell receptor“, BCR). Dieser BCR ist eine membrangebundene Form des Antikörpers IgM („Frühantikörper“). Bindet nun eine B-Zelle über ihren BCR ein Antigen, so wird der Antigen-Antikörperkomplex internalisiert und proteolytisch abgebaut. Das Antigenfragment wird schließlich an einem MHC-Klasse-II-Molekül gekoppelt auf der B-Zelloberfläche den schon durch antigenpräsentierenden Zellen (meistens dendritischen Zellen) induzierten CD4 T_H-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Milz, Peyerischen Platten und den mukosal-assoziierten lymphatischen Geweben präsentiert. Diese binden nun an die B-Zelle und stimulieren durch Abgabe von Interleukinen deren selektive klonale Vermehrung und deren Umwandlung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen, welche nun vermehrt IgG Antikörper ausschütten (Klassenwechsel) [175]. Diese klonale Proliferation der B-Zellen etabliert sekundäre Follikel in lymphatischen Organen wie Milz oder Lymphknoten, welche als Keimzentren bezeichnet werden [156]. Antikörper sind Y-förmige Moleküle und bestehen aus jeweils zwei gepaarten schweren und leichten Polypeptidketten, wobei die variablen Bereiche einer schweren und einer leichten Kette die Antigenbindungsstelle darstellen. Demnach besitzt jeder Antikörper zwei identische Bindungsstellen für Antigene. Es gibt fünf Klassen von Antikörpern in der Familie der Immunglobuline (IgM, IgD, IgG, IgA und IgE). Die Klassenbestimmung wurde anhand der unterschiedlichen konstanten Regionen dieser 5 Antikörper ermöglicht. Dieser unterschiedliche Aufbau ermöglicht den in das Blutplasma und in die umgebenden Körperflüssigkeiten sezernierten Antikörpern verschieden Aufgaben (humorale Antwort). Antikörper haben die Aufgabe Antigene durch Bindung zu neutralisieren, für die unspezifische Immunität Abwehrzellen als Fremdkörper zu opsonisieren und das Komplementsystem zu aktivieren. Demnach können Antikörper die Erreger nicht aktiv eliminieren, sondern ermöglichen durch die Komplexbildung mit den Antigenen deren Markierung, so dass das Komplementsystem, neutrophile Zellen oder Makrophagen diese zerstören [141].

2.2.4 Das immunologische Gedächtnis

Das Ziel aller Impfstoffstrategien ist die Induktion einer lebenslangen Immunität [250]. Demnach muss eine ideale Vakzine Gedächtnislymphozyten bilden. Diese auch Gedächtniszellen genannten Lymphozyten, differenzieren sich aus aktivierten T-Zellen heraus und wandern so lange durch die lymphatischen Gewebe und Organe, bis sie erneut auf ihren Erreger treffen. Dadurch verläuft die Immunantwort schneller und effektiver als beim Erstkontakt (Immunreaktion vom „verzögerten Typ“), so dass eine erneute Erkrankung ausbleibt oder wesentlich schwächer verläuft. Demnach müssen sich die Gedächtniszellen qualitativ und quantitativ von denen unterscheiden, die noch nicht mit Antigenen in Kontakt gekommen sind [21]. Zum Beispiel ist die wichtigste Eigenschaft von B-Gedächtniszellen die Produktion von somatisch mutierten, hochaffinen Antikörpern der IgG-Klasse und durch jeden weiteren Antigenkontakt steigt sowohl die Affinität als auch die Menge der sezernierten Antikörper weiter an [196]. Die T-Gedächtniszellen dagegen sind im Vergleich zu T-Zellen sensitiver gegenüber geringen Antigenmengen, weniger abhängig von Kostimulation, synthetisieren schneller Zytokine und differenzieren schneller zu Effektorzellen [158, 11, 134]. Des Weiteren wurden T-Gedächtniszellen in zwei phänotypisch und funktionell unterschiedliche Subpopulationen eingeteilt [261]. Es konnte gezeigt werden, dass für das Überleben von T-

Gedächtnis-zellen der Kontakt zum Antigen nicht unbedingt notwendig ist. [217, 294]. Die Gruppe um Maini veröffentlichte, dass die Antigenpräsenz in manchen chronischen Infektionen das Überleben der Gedächtniszelle begünstigte [197]. Eine starke primäre klonale Expansion führt außerdem zu einer länger anhaltenden Gedächtnisantwort.

Demnach sollte bei der Entwicklung von Impfstoffstrategien beachtet werden, dass entweder die Impfung zu einer möglichst starken klonalen Expansion der Immunzellen führt oder dass zur Impfung ein Vektor gewählt wird, der eine lange Persistenz des Antigens garantiert.

2.3 Neue Impfstofftechnologien

Ein moderner Impfstoff muss das Ziel haben, durch aktive Immunisierung Gedächtniszellen zu bilden (Langzeitschutz). Die konventionellen Totimpfstoffe bestehen u. a. aus durch Hitze oder Formalin abgetöteten Erregern, aus modifiziertem Produkt (Toxoide) oder aus Bestandteilen des Erregers (Spaltimpfstoffe). Durch Zugabe von Hilfsstoffen (Adjuvantien) wie z. B. Aluminiumhydroxid/phosphatgel, wird deren Antigenität verstärkt [117]. Diese konventionellen Impfstoffe erzielten bisher ihre Wirkung, indem sie durch Bildung von neutralisierenden und opsonisierenden Antikörpern die systemische Ausbreitung der Pathogene und die Wirkung von Exotoxinen verhinderten [319]. Demnach generierten diese angewandten Impfstoffe hauptsächlich humorale Immunantworten gegen die Erreger. Ein Nachteil der Auslösung einer humoralen Immunantwort ist deren kurzfristige Wirksamkeit, weswegen Auffrischungsimpfungen notwendig sind [67]. Für die Bekämpfung gegen Infektionskrankheiten, welche vor allem durch intrazelluläre Erreger verursacht werden, können diese konventionellen Impfstoffe nicht wirken. Man ist sich heute einig, dass neben den humoralen, zelluläre Immunantworten, vor allem deren zytotoxische T-Zellen benötigt werden, damit eine neue Infektion vermieden wird und infizierte Zellen ausreichend eliminiert werden [319, 135, 165]. Nichtsdesto trotz werden verbesserte konventionelle Impfstoffe z. B. gegen Diphtherie und Tetanus (Toxoid) oder auch gegen Malaria (Spaltimpfstoffe) eingesetzt. Eine Verbesserung dieser gelang z. B. durch zielgerichtete Mutationen im biologischen aktiven Bereich, durch chemische Modifikation mit z. B. Peptid-Lipoid-Kopplungen und durch Verwendung neuer Adjuvantien, wie z. B. Liposomen, biologisch abbaubare Mikrosphären und Nanopartikel, TH1-zellstimulierende Zytokine, Oligonukleotide mit reichhaltigen CpG-Motifen oder immunstimulierende Komplexe wie ISCOM („immune stimulating complex“) [154].

Weitere Entwicklungen in der Impfstoffforschung sind konjugierte Impfstoffe oder Kombinationsimpfstoffe [184]. Unter konjugierten Impfstoffen versteht man nichtzelluläre, rekombinante Impfstoffe, die aus mehreren Polysaccharid-Außenhüllen einiger Erreger bestehen. Durch Verbindung dieser Außenhüllen mit Proteinen (wie Toxinen), kann das Immunsystem dazu gebracht werden, die Polysaccharide wie Proteinantigene zu erkennen. Kombinationsimpfstoffe bestehen aus einer Mischung von einzelnen Impfstoffen gegen bis zu fünf Krankheiten.

Auch bakterielle „ghosts“ sollen als neue Impfstoffe eingesetzt werden. Bei bakteriellen „ghosts“ handelt es sich um Bakterien, die durch Phagentoxine zerstört wurden. Solche Bakterien ohne Zytosol, also leere Bakterienhüllen („ghosts“) dienen zum Transfer von Fremdantigenen oder DNA-Plasmiden [9]. Diese bakteriellen „ghosts“ zeigten sich schon sehr effizient im Übertragen von Plasmid-DNA in DCs oder von therapeutischen Wirkstoffen gegen Krebs [171, 230].

Tabelle 2.2: Die Impfstoffgenerationen

| Totimpfstoffe | Lebende attenuierte Impfstoffe |
|-------------------------------------|--|
| abgetötete Erreger | Gendeletionsmutanten |
| Toxoide | rekombinate Trägersysteme (Vektorvakzine) |
| Spaltimpfstoffe | natürlich vorkommende avirulente Stämme |
| Kombinationsimpfstoffe | induzierte Mutanten (chemisch, gentechnisch) |
| konjugierte Impfstoffe | |
| synthetisch hergestellte Impfstoffe | |
| Adjuvantien | |
| (Liposomen, Squalen, ISCOMS) | |
| bakterielle „ghosts“ | |
| DNA-Impfstoffe | |
| RNA-Impfstoffe | |
| körpereigene Zellen und Moleküle | |
| (DC, MØ, Zytokine, Stressproteine) | |

Eine neuere Entwicklung der Impfstoffforschung stellt der DNA-Impfstoff, dar [64, 68]. Im Prinzip wird dabei ein eukaryotisches Expressionsplasmid entweder in physiologischer Kochsalzlösung (Immunisierung mit nackter DNA) oder an Lipide, Liposomen oder Goldpartikel gekoppelt verabreicht. Auf diesem Plasmid liegt das gewünschte Antigen als cDNA unter der Kontrolle eines meist starken konstitutiven eukaryotischen Promotors, wie z. B. dem Zytomegalievirus „immediate early“ Promotor vor [10, 167]. Zusätzlich wird die Expression des Antigens durch ein vorgestelltes Intron wie Intron A gesteigert und zur Stabilisierung der mRNA wird eine Polyadenylierungs-Sequenz verwendet [91]. Da die Plasmid-DNA im Prokaryoten wie *E. coli* kloniert und angereichert wird, enthält diese Plasmid-DNA ein Replikationsursprung und ein Antibiotika-Resistenz-Gen [10]. Nach der intramuskulären, subkutanen oder intradermalen Applikation wird die DNA in Wirtszellen (Muskelzellen, APC) aufgenommen und das Gen, welches für das Antigen kodiert, wird exprimiert und das Antigen über MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen an CD8 und CD4 T-Zellen präsentiert. Weiterhin kann das in Wirtszellen synthetisierte Antigen auch effizient B-Zellen stimulieren, so dass es zur Produktion hoher Antikörpertiter kommt [9, 154, 167]. Ferner können immunmodulatorische Aktivatoren wie CpG-Motife (Adjuvanzeffekt) oder auch zytokinkodierende Gene auf dem Plasmid vorhanden sein, welche ihrerseits die Immunantwort fördern („zweite Generation DNA-Vakzine“) [9, 154]. Des Weiteren kann die niedrigere Effizienz der Auslösung einer Immunantwort durch Immunisierung mit nackter Plasmid-DNA dadurch gelöst werden, indem Trägersysteme die Plasmid-DNA in die Wirtszelle transportieren. Es gibt heute eine Reihe sowohl lebender als auch abgetöteter mikrobieller Trägersysteme (z. B. attenuierte rekombinate Viren und Bakterien, bakterielle „ghosts“), sowie verschiedene synthetische Trägermoleküle (z. B. Liposomen, Proteasomen, immunstimulierende Komplexe) [9, 113]. Dabei sollen Trägersysteme das plasmidkodierte Antigen möglichst gezielt und langsam freisetzen, um eine effiziente Immunantwort gegen das in dem DNA-Vakzin enthaltene Antigen zu erzielen [9].

Eine weitere neue Impfstoffstrategie ist die Impfung mit körpereigenen Zellen und Molekülen. Vor allem dendritische Zellen, die als starke Induktoren der spezifischen Immunantwort beschrieben

sind, werden als Impfstoffe verwendet [89]. Dafür werden dendritische Zellen aus dem Menschen z. B. eines Krebspatienten gewonnen und mit Tumorpeptiden beladen und zur Impfung eingesetzt. Eine Verbesserung der Immunantwort kann zusätzlich durch gleichzeitige Gabe von Zytokinen oder Stressproteinen erreicht werden. Die Zugabe dieser kann als Gene in rekombinanten Impfstoffträgern als DNA-Impfstoffe, RNA-Impfstoffe oder als Protein einer Spaltvakzine erfolgen [154, 112]. Auch Makrophagen können mit dem gewünschten Antigen ex vivo transfiziert werden, um als Impfstoff in den Wirt wieder eingeschleust zu werden [38].

Eine andere Strategie besteht darin, lebende Mikroorganismen als Träger für Antigene zur Immunisierung einzusetzen [184]. Bei dieser Art von Lebendvakzinen handelt es sich um abgeschwächte (attenuierte) Viren oder Bakterien, die entweder Immunität gegen sich selbst (homologe Antigene) oder Immunität gegen ein fremdes (heterologe Antigene) „Passagier“-Antigen vermitteln, ohne in der Regel eine Erkrankung auszulösen [64]. Dabei können sie das Antigen in Form von plasmidkodierter DNA, RNA oder als Protein übertragen. Im Rahmen dieser Arbeit wird näher auf virulenzattenuierte, intrazelluläre Bakterien, die heterologe Antigene übertragen, eingegangen.

Der Einsatz von attenuierten Bakterien als Vakzineträger (rekombinate Träger) hat den Vorteil, dass diese aufgrund ihrer natürlichen PAMPs, wie z. B. bakterielle Zellwandkomponenten oder unmethylierte CpG-DNA-Sequenzen als starke Immunaktivatoren wirken [167, 301]. Man benötigt keine zusätzlichen Adjuvantien [306], da durch den Einsatz dieser Erreger schon eine natürliche Infektion, mit einer daraus resultierenden Immunabwehr mit angeborenen sowie vor allem auch mit erworbenen, spezifischen Abwehrmechanismen etabliert wird. Die Etablierung der adaptiven Immunität führt nicht nur zu einer humoralen Immunantwort, sondern vor allem auch zu einer zellvermittelten. Da die Produktion der Antigene durch intrazelluläre Erreger wie z. B. Listerien, Shigellen hauptsächlich im Zytosol stattfindet [224], kann dies schließlich in der Präsentation der prozessierten Antigenpeptide über MHC-Klasse-I-Moleküle resultieren. Schließlich können dadurch spezifische CTLs der zellvermittelten Abwehr generiert werden. Diese zellvermittelte Immunität führt letztendlich zu einer längeranhaltenden Protektion. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass solche Lebendvakzine, auch zusätzlich Zytokine exprimieren und auf diese Weise die Stimulation der gewünschten Immunantwort verbessern. Auch die Antigen-Darbietung durch Lebendvakzine kann die Impfeffektivität deutlich beeinflussen [155]. Ein weiterer Vorteil von attenuierten Erregern als Impfstoffträger ist, dass von diesen schon geringere Dosen zu einer Protektion führen, wohingegen mit den konventionellen Impfstoffen meist wiederholte und relativ hohe Dosen appliziert werden müssen [64, 154]. Außerdem sind Lebendvakzine sehr leicht und billig produzierbar, lagerbar und transportierbar [64]. Ebenfalls benötigen sie auch keine spezielle, teure Aufreinigung, wie z.B. die synthetisch hergestellten Vakzine. Die gleichzeitige Gabe des Erregers und des heterologen Antigens kann auch sehr attraktiv sein, da eine gleichzeitige Immunantwort gegen das Trägerbakterium selbst und gegen das zu übertragende Antigen erzielt wird [202].

Vor allem virulenzattenuierte Stämme von Enteropathogenen wie Salmonellen, Shigellen, Yersinien, Vibrios, Escherichia colis oder Listerien wurden schon erfolgreich als Vakzineträger eingesetzt, da bei oraler Applikation dieser Erreger zusätzlich neben der systemischen auch die mukosale Immunität induziert werden kann, weil als erstes die mukosalen Oberflächen infiltriert werden (zusammengefasst in [256, 220, 301]).

Im Allgemeinen stellt man virulenzattenuierte Bakterien her, indem die Virulenz abgeschwächt oder eliminiert, aber gleichzeitig die Immunogenität aufrechterhalten wird. Dies kann durch die Herstellung von auxotrophen Stoffwechselmutanten, durch die Deletion von regulatorischen Genen oder durch die Deletion von wichtigen Virulenzfaktoren, erreicht werden [165]. Dabei werden vor allem Gene von Virulenzfaktoren deletiert, welche für das intrazelluläre Überleben und die interzelluläre Mortalität verantwortlich sind [67, 206, 289, 29]. Die Herstellung von auxotrophen Stoffwechselmutanten ruft eine Attenuation hervor, in dem die Mutanten in ihrem Stoffwechsel an entscheidenden Stellen (z. B. aromatische Aminosäurebiosynthese) geschädigt sind und sich somit nicht mehr ohne Medienzusätze in der Umwelt vermehren können [96, 131, 289]. Solche attenuierten Mutanten wurden schon erfolgreich als Vakzineträger eingesetzt (zusammengefasst in [165, 256]). Des Weiteren kann im Falle einer auftretenden Komplikation mit bakteriellen Erregern eine Antibiotikabehandlung eintreten, was beim Einsatz mit Viren nicht der Fall ist. Die Aufrechterhaltung der Immunogenität wird z. B. dadurch gewährleistet, dass bakterielle Gene, welche Produkte kodieren die für eine protektive Immunität gegen den Träger benötigt werden, nicht deletiert werden.

In dieser Arbeit wurden virulenzattenuierte Bakterien der Art *Listeria monocytogenes* (*Lm*) als Überträger von heterologen Proteinantigenen (Vakzine) eingesetzt. In den nachfolgenden Abschnitten wird nun das Pathogen *Lm* näher beschrieben und auf seine Fähigkeit als Vakzineträger eingegangen.

2.3.1 *Listeria monocytogenes* als Impfstoffträger

2.3.1.1 Charakteristika und Klassifikation des Bakteriums *Listeria monocytogenes*

Das Bakterium *Listeria monocytogenes* (*Lm*) wurde erstmals 1924 von E.G.D. Murray und Mitarbeitern in Cambridge unter dem Namen „*Bacterium monocytogenes*“ als Erreger einer Sepsis bei Kaninchen und Meerschweinchen isoliert [219]. 1929 beobachtete Nyfeld die gleichen Bakterien als Krankheitserreger beim Menschen. Die heute gültige Bezeichnung erfolgte zu Ehren des englischen Chirurgen Joseph Lister (1827-1912), dem Begründer der Antiseptik [118].

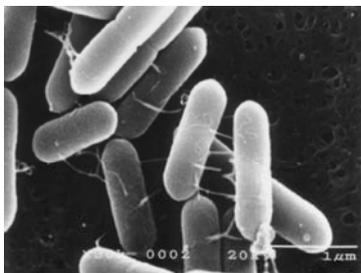


Abb 2.3: *Listeria monocytogenes*

Das human- und tierpathogene Bakterium *Lm* gehört zu den Gram-positiven, nicht-sporulierenden, nicht-kapselbildenden, regelmäßig geformten kurzen Stäbchen mit einer Größe von $0.5 \times 1-2 \mu\text{m}$ (Abb. 2.3) [192]. Listerien sind einzeln oder in Ketten gelagert, selten in längeren Filamenten. Charakteristisch für diese Bakterien ist, dass sie bei Temperaturen von 0.4 bis 50 °C wachsen [149, 298]. Auf „Brain Heart Infusion“ (BHI) Agarplatten bilden sie grauweiße, glatte Kolonien. *Lm* zeigt auf Blutagarplatten β -Hämolyse [118]. In einem Temperaturbereich von 20- 25 °C ist *Lm* aufgrund der Expression peritricher Geißeln beweglich [157]. Bei 37 °C ist es infolge der herabgesetzten Produktion von Flagellin monopolar monotrich begeißelt [231]. Die Katalase-positiven und Oxidase-negativen Listerien sind fakultative Anaerobier und bauen Glucose fermentativ ab. Optimale Anzucht der Bakterien gelingt bei

Temperaturbereichen von 30- 35 °C in einem Medium mit neutralem bis leicht alkalischen pH-Werten [157].

Lm ist ein ubiquitär vorkommender Umweltkeim, dem es möglich ist, mehrere verschiedene Naturreservare wie Boden, Wasser und Pflanzen besiedeln zu können. Außerdem kann dieses Bakterium aus dem Gastrointestinaltrakt von verschiedenen Säugetieren wie Kühen, Schafen, Ziegen und Vögeln isoliert werden [302]. Etwa 10 % der Bevölkerung tragen *Lm* als Bestandteil ihrer Darmflora, ohne dass dies zu einer Beeinträchtigung ihrer Gesundheit führt [106]. Als natürliches Habitat wird hauptsächlich verwesenes Pflanzenmaterial angesehen, indem sie saprophytisch leben. Ebenso stellt *Lm* ein ernsthaftes Problem für die Nahrungsmittelindustrie dar, da es sich auch unter extremen Bedingungen (hohe Salzkonzentration, niedriger pH, niedrige Temperatur) vermehren kann [157].

Taxonomisch sind Listerien in die Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt (36-42 %) einzuordnen. Dieser Kategorie gehören außerdem die Gattungen *Bacillus*, *Brochothrix* und *Lactobacillus* an [47]. Nach dem heutigen Stand zählen zu der Gattung *Listeria* außer *L. monocytogenes*, die ebenfalls human und tierpathogene Spezies *L. ivanovii* und die apathogenen Spezies *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und die Subspezies *L. grayi* [192]. Letztere unterscheidet sich durch 16S-rRNA-Vergleiche deutlich von den anderen fünf Arten [253]. Aufgrund verschiedener H- und O-Antigene wird *Lm* in 16 verschiedene Serovare (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 6a(4f), 6b(4g) und 7) unterteilt, wovon nur drei Serovare (1/2a, 1/2b und 4b) in 90% der Fälle bei Mensch und Tier Listeriose verursachen [192].

Mit Hilfe moderner molekularbiologischer Methoden, wie DNA-Fingerprinting, DNA-DNA-Hybridisierung, Fettsäureanalyse (FAME), Pulsfeld-Gelelektrophorese, PCR, Phagotyping, Sequenzierung, Mikroarray und Ribotyping lassen sich die einzelnen Arten von Listerien schnell und zuverlässig identifizieren und differenzieren [92].

2.3.1.2 Pathogenese

Die von *Listeria monocytogenes* hervorgerufene Listeriose wurde in Unkenntnis des Erregers erstmalig von Henle 1893 als „Pseudotuberkulose bei neugeborenen Zwillingen“ beschrieben. Die Inzidenz der Listeriose liegt in Deutschland bei ca. $6/10^6$ pro Jahr [81]. Erfasst werden in Deutschland allerdings nur die konnatale Listeriose (30-40 pro Jahr) und die meningitische Verlaufsform [249]. Obwohl Listerien als Umweltkeime weit verbreitet sind, ist die humane Listeriose eine seltene Erkrankung mit sporadischem Auftreten bei Gesunden. Trotz frühzeitiger Antibiotikabehandlung ist sie jedoch mit einer hohen Mortalitätsrate von ca. 30 % gekennzeichnet. Für die humane Listeriose sind in erster Linie mit *Lm* kontaminierte Lebensmittel wie z. B. Rohmilchprodukte (Käse) und rohes Fleisch (Hackfleisch) verantwortlich [249]. Die Fähigkeit von *Lm* auch noch bei 4 °C, also Kühlschranktemperaturen zu wachsen, ermöglicht es ihm, auch in gekühlten Lebensmitteln kritisch hohe Keimzahlen zu erreichen. Eine weitere Möglichkeit der Infektion besteht im direkten Kontakt mit erkrankten Tieren oder mit kontaminiertem Erdboden, z.B. in der Landwirtschaft. Gesunde Personen erkranken bei der Aufnahme der Bakterien in der Regel nicht. Einer höheren Gefährdung sind Personen mit geschwächtem Immunsystem ausgesetzt. Hier kann schon eine Keimzahl von 10^6 ausreichen, um eine Listeriose auszulösen [81].

Zu den Risikogruppen gehören u. a. Säuglinge, ältere Menschen, Krebs-, Diabetes-, AIDS-Kranke, sowie Schwangere. Letztere können die Infektion an den Fötus durch diaplazentalen Übertritt des Erregers weitergeben [129]. In der Regel ist die Infektion für die Schwangere nicht lebensgefährlich, sie erleidet aber möglicherweise eine Früh- oder Totgeburt oder bringt ein lebensgefährlich infiziertes Kind zur Welt. Bei den lebend Geborenen beträgt die Letalitätsrate in den ersten Wochen nach der Geburt ca. 50 %. Jedoch sind auch immer wieder Spätschäden in Form von geistigen Entwicklungsstörungen zu beobachten.

Die Listeriose tritt in der Regel als Infektion des Nervensystems (Meningitis, Enzephalitis, Meningoencephalitis) oder als Bakteriämie (Sepsis) auf, da die Bakterien die Blut- und Hirnschranke überwinden können [249]. Als Symptome treten Fieber, starke Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen auf. Je nach Verlaufsform der Erkrankung kann es zur Ausbildung von Granulomen und Abszessen in den inneren Organen kommen, den so genannten Listeriomen. Endokarditis oder Hepatitis werden sehr selten beschrieben (Abb.: 2.4). Etwa 1-5 % der Infektionen mit *Lm* verlaufen asymptomatisch. Die Personen werden zu „Trägern“ und stellen somit für das Pathogen ein Reservoir dar [43].

Eine sichere Diagnose ist der bakteriologische Nachweis von *Lm* durch Kultivierung aus physiologisch sterilen Proben wie Blut oder Liquor. Eine Isolierung aus Plazenta und Fruchtwasser bei bestehenden klinischen Symptomen deutet auf eine Erkrankung hin. Der Nachweis im Stuhl ist dagegen nicht von großem Nutzen, da gesunde Träger vorkommen [249].

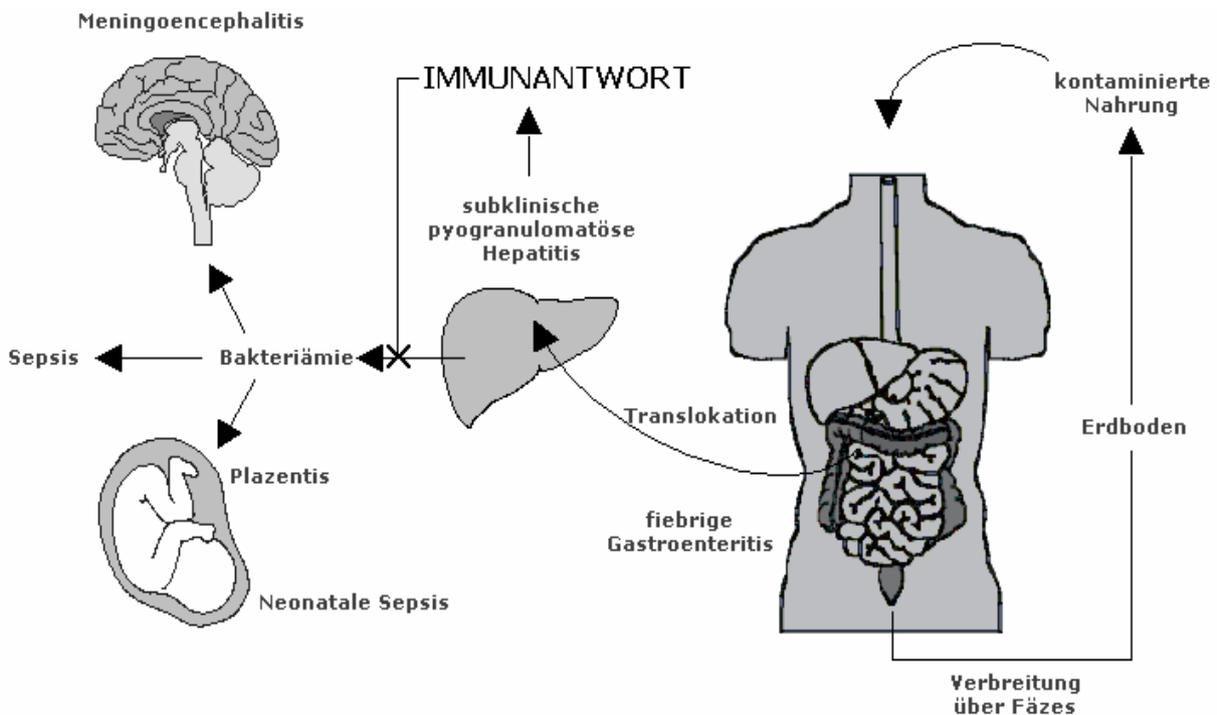


Abb. 2.4: Pathogenese einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* (modifiziert nach Vazquez-Boland et al, 2001 [302]).

Als Therapie der Wahl wird die Kombination eines β -Lactamantibiotikums (Ampicillin) und eines Aminoglykosids (Gentamicin) mit synergistischem Effekt angesehen. Bei Patienten mit einer

Penicillinallergie kann alternativ Chloramphenicol gegeben werden. Die Dauer der Therapie beträgt je nach Krankheitsbild 2 bis 6 Wochen.

Als Prophylaxe sollten besonders gefährdete Personen pasteurisierte Milch trinken, vollständig gegartes Fleisch essen und Gemüse vor dem Verzehr sorgfältig putzen [268].

2.3.1.3 Interaktionen von *Listeria monocytogenes* mit eukaryotischen Zellen und Geweben

Lm ist ein Pathogen, das ein sehr breites Wirtszellspektrum (Epithelzellen, Hepatozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen) besitzt und einen ähnlichen intrazellulären Replikationszyklus in diesen Zelltypen durchläuft (Abb.: 2.5). Der Zyklus beginnt mit der Internalisierung der Bakterien entweder durch Phagozyten oder die Bakterien werden von nicht-professionell-phagozytierenden Zellen durch eine induzierte Phagozytose über den so genannten Zippermechanismus aufgenommen [54].

Der Eintritt in nicht-phagozytierende Zellen wird dabei hauptsächlich von den Wirtsoberflächenrezeptoren (Komplement-Rezeptoren, Glykoprotein E-Cadherin, Met-Rezeptor, Heparinsulfat-Proteoglykane und Fibronectin) und deren listerielle Oberflächenproteinliganden (Internaline InIA und InIB, der Aktinpolymerisierende Faktor ActA, das p60-Protein, das Protein Ami und das Oberflächenprotein FbpA) vermittelt [74].

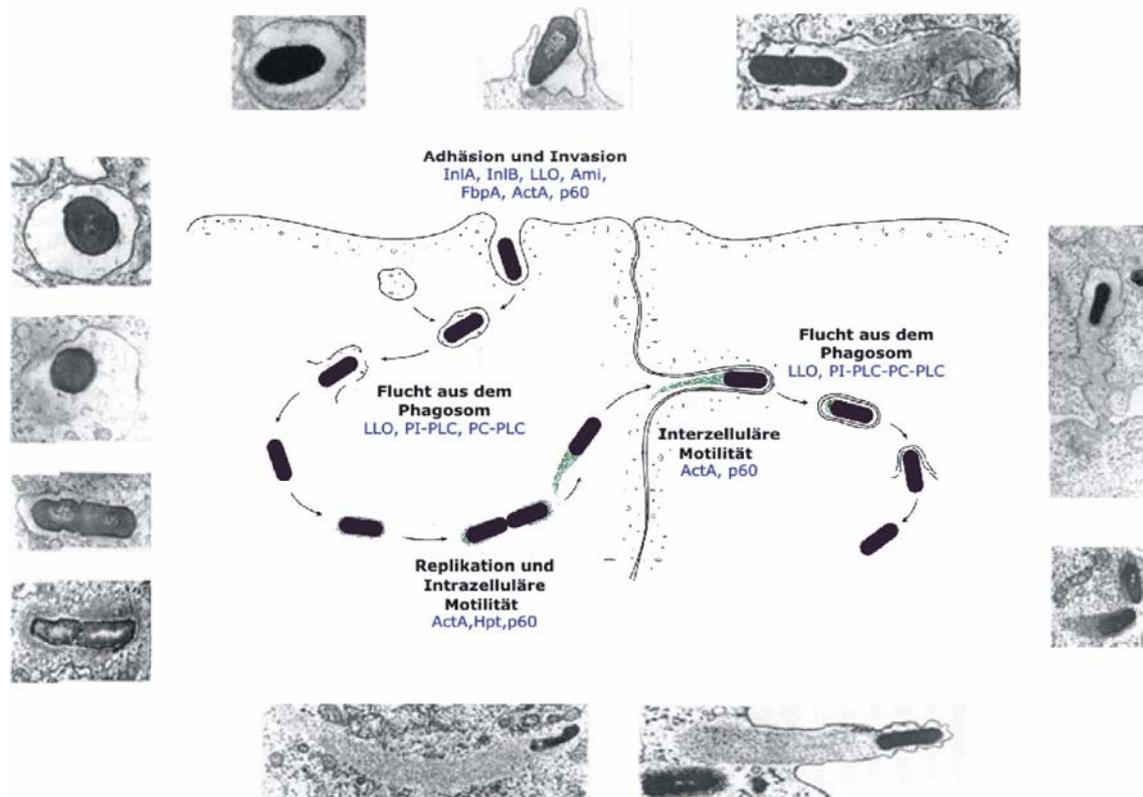


Abb. 2.5: Infektionszyklus und daran beteiligte Virulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes* (modifiziert nach Tilney & Portnoy, 1989; Portnoy, 2002; Altrock, 2002 [298, 4, 238]).

Dabei sind die Internaline InIA (*inlA*) und InIB (*inlB*) hauptverantwortlich für die Vermittlung der Internalisierung in Wirtszellen. Das InIA fördert dabei die Internalisierung durch die Bindung an die

extrazelluläre Domäne des humanen Wirtszellrezeptors E-Cadherin [204]. Dies führt zur Adhäsion von *Lm* an die Wirtszelle. Dabei ist ein Prolinrest an Position 16 des humanen E-Cadherins essentiell für die Interaktion mit InIA [41]. Das E-Cadherin der Maus besitzt an dieser Stelle eine Glutaminsäure und dadurch vermittelt es keine InIA-abhängige Internalisierung [180]. Das humane E-Cadherin selbst bildet zusammen mit den Proteinen der Plakoglobin-Familie, den Cateninen α , β und γ einen Komplex [3]. Bei der Interaktion mit Cadherinen können diese Catenine durch Tyrosin-Protein-Kinasen der Src-Familie phosphoryliert werden und auf diese Weise wird ein durch Cadherin von der extrazellulären Matrix vermitteltes Signal in der Zelle weitergeleitet [161]. Dadurch wird mittels der Catenine eine Verbindung zwischen Cadherinen in der Zellmembran und dem die Zelle umgebenden Gürtel von Aktin- und Myosinfilamenten hergestellt. Dies führt schließlich zu Rearrangements des Aktinzytoskeletts und die Bakterien werden invadiert [161, 3]. InIA benötigt, im Gegensatz zu InIB, die Hilfe von den anderen Internalinen InIB, InIC, InIG, InIH und InIE für den Invasionsprozeß [264].

Im Gegensatz zu InIA, das einen eingeschränkten Wirtszelltropismus besitzt, ist InIB für die Invasion in ein breiteres Spektrum von eukaryotischen Wirtszellen (Hepatozyten, Vero Zellen, Fibroblasten, HeLa-Zellen, Epithelzellen und Endothelzellen) verantwortlich [32, 109, 31]. InIB vermittelt in diesen Zellen die Internalisierung über den gC1q-R, allgemein als Rezeptor für den globulären Teil des Komplementfaktors C1q bekannt [30], und über den Met-Rezeptor, dessen einzig bisher bekannter Ligand der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) war [277]. Diese InIB-vermittelte Invasion von *Lm* in Eukaryontenzellen verursacht einen rapiden und effizienten Anstieg der Lipidprodukte der Phosphoinositid-3-Kinase (PI(3)-Kinase), stimuliert die Tyrosinphosphorylierung von Wirtszellrezeptoren wie Gab1, Cbl und Shc und sorgt für die Assoziation derer mit der p85-Domäne der PI(3)-Kinase [32, 31, 30]. Die Aktivierung der Kinase führt zu weiteren Signalkaskaden z. B. zur Aktivierung der PLC- γ 1, die schließlich indem Rearrangement des Aktinzytoskeletts münden [138, 139].

Nach der Invasion liegen die Bakterien ungefähr für 30 min in einer phagozytischen Vakuole (primäres Phagosom) vor, bevor sie sich aus diesem Kompartiment befreien können [85]. Die Ansäuerung und das Einbringen toxischer Sauerstoffderivate wie Superoxid und Wasserstoffperoxid durch Fusion mit Lysosomen in dieses Kompartiment wird durch die charakteristische Säuretoleranz und durch die listeriellen Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD, *sod*) und Katalase (*kat*) unwirksam gemacht [74]. Die Lyse der Vakuolenmembran wird hauptsächlich durch das Cholesterol-bindende porenbildende Zytolysin Listeriolysin O (LLO, *hly*) verursacht und synergetisch durch zwei listerielle Phospholipasen: die Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase (PI-PLC, *plcA*) und die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC *plcB*) unterstützt (zusammengefasst in [104]). LLO-Mutanten sind unfähig sich aus dem Phagosom zu befreien. PC-PLC wird im Gegensatz zu PI-PLC von der listeriellen exprimierten Metalloprotease (*Mpl*, *mpl*) aktiviert [302]. LLO wirkt, indem es von seiner monomeren löslichen Form in eine unlösliche, bogen- oder ringförmige Oligomerstruktur übergeht [119]. Im oligomeren Zustand kann es sich in die Membran einlagern und dort Poren von ca. 20 bis 30 nm Durchmesser bilden. Diese Poren dienen als Durchtrittsstellen der Phospholipasen, die somit an ihre Substrate gelangen. LLO kann seine Wirkung in diesem angesäuerten Kompartiment vollziehen, da sein pH-Optimum von 5,5-6,0 und der enge pH-Wirkungsbereich von pH 4,5- 6,5 eng mit diesem korreliert [14, 101]. Im Zytoplasma, einem Kompartiment mit einem eher neutralen pH-Wert ist das LLO inaktiv. Dort wird es auch aufgrund

seiner PEST-ähnlichen Sequenz am N-terminalen Ende rasch im Proteasom abgebaut, wodurch die Lyse der Wirtszelle verhindert wird [60]. LLO stimuliert auch sehr viele Wirtszellantworten: dies beinhaltet die Interleukin-1 Sekretion in Makrophagen [314], die Aktivierung der mitogenaktivierenden Proteinkinase in HELA-Zellen [297], Induktion von Apoptosis [114], die Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf infizierten Endothelzellen [169], zahlreiche Zytokinausschüttungen in Milzzellen [162] und die NF- κ B-Aktivierung in menschlichen embryonalen Nierenzellen [156].

Innerhalb von zwei Stunden liegen ca. 50% der Bakterien frei im Zytoplasma vor und vermehren sich mit einer Verdopplungszeit von ca. einer Stunde [298]. Das Entkommen aus dem Phagosom ist essentiell für das Überleben und die Vermehrung von *Lm* in der Wirtszelle. Die sich nun frei im Zytoplasma befindenden Bakterien beginnen sofort mit der Polymerisation von zellulärem G-Aktin, vermittelt durch das auf der Oberfläche der Bakterien lokalisierte Aktin-Nukleatorprotein ActA (*actA*) [74]. Zunächst werden die Listerien von einer diffusen Aktin-Wolke umgeben. Im weiteren Verlauf entsteht an einem Pol des Bakteriums ein kometenartiger Schweif [298]. Indem die Bakterien am Pol fortwährend G-Aktin polymerisieren, der Aktinschweif selbst aber stationär bleibt, können sich die Bakterien frei durch das Zytoplasma bewegen (intrazelluläre Motilität). Der Wirkmechanismus von ActA liegt in der Nachahmung von Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteinen (WASPs), welche in Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex die Aktinnukleation bewirken [53]. Außerdem scheint ActA bei der Internalin-unabhängigen Aufnahme von *Lm* in Epithelzellen beteiligt zu sein [5, 290]. Die Theorie ist, dass ActA die Bindung an Heparinsulfat-Proteoglykane (HSPGs) auf der Oberfläche der Zelle vermittelt. Auch *L. ivanovii* ist zu dieser Fortbewegung fähig und dies wiederum unterstreicht die Wichtigkeit des ActA-Proteins als Virulenzfaktor. Das Protein p60 ist neben dem Aktinrearrangement ebenso für eine intakte Septumbildung nötig, und wirkt als Autolysin mit Mureinhydrolase-Aktivität. Deshalb wurde vorgeschlagen den Namen des Genes (*iap*), das p60 kodiert, in *cwhA* („cell wall hydrolase A“) umzuändern [234].

Das Zytoplasma stellt eine optimale Nische für dieses Bakterium dar. Es nutzt Glucose-1-Phosphat neben anderen freizugänglichen Zuckern als Nahrungsmittel [41]. Verantwortlich für die Glucoseaufnahme und damit für die intrazelluläre Replikation ist der virulenzregulierte (PrfA-abhängig) Hexosephosphattransporter Hpt (*hpt*), der Ähnlichkeiten zum eukaryotischen Glucose-6-Phosphattransporter besitzt [46, 74].

Lm wandert im Zytoplasma mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von ca. 0,3 $\mu\text{m/s}$ und gelangt so zur Zellperipherie [55]. Wenn das Bakterium die Innenseite der Plasmamembran der Wirtszelle erreicht, induziert es die Ausbildung einer pseudopodienartigen Membranausstülpung, die von der Nachbarzelle oder von Phagozyten aufgenommen wird [41]. Dieser Vorgang wird ebenso durch das listerielle Protein ActA vermittelt. Die Listerien gelangen so von einer Wirtszelle in die nächste, ohne das intrazelluläre Milieu verlassen zu müssen (interzelluläre Motilität). Das nun in der Nachbarzelle befindliche Bakterium ist von einer Doppelmembran umgeben, aus der es sich ebenfalls sehr schnell (5 min) befreien kann [302]. An der Lyse sind das oben erwähnte LLO und die beiden listeriellen Phospholipasen PC-PLC und PI-PLC beteiligt. Die Bakterien gelangen so in das Zytoplasma und beginnen einen neuen intrazellulären Replikationszyklus, verbunden mit weiterer Aktinpolymerisation und somit auch mit einer weiteren Zell-zu-Zell-Ausbreitung.

Lm ist in seinem intrazellulären Lebenszyklus vor allem von LLO zur Freisetzung der Bakterien aus dem Phagosom, und von dem ActA-Protein zur intrazellulären Bewegung der Bakterien abhängig.

Dies erklärt den nahezu völligen Verlust der Virulenz der Mutanten, die einen Defekt in der Synthese eines dieser beiden Proteine aufweisen [224].

Dieser spezifische intrazelluläre Lebenszyklus erklärt auch, warum gerade immunsupprimierte Personen, Neugeborene und schwangere Frauen gegenüber Infektionen mit diesem Bakterium so anfällig sind. Da *Lm* intrazellulär stets von mindestens einer Wirtszellmembran umgeben ist, entzieht es sich auf dieser Weise der humoralen Immunantwort. Nur eine zellvermittelte Immunantwort führt zu einer protektiven Immunität [152].

2.3.1.4 Virulenzgencluster von *Listeria monocytogenes*

Die Virulenz der Listerien wird in erster Linie von ihrer Fähigkeit zum fakultativ intrazellulären Parasitismus bestimmt. Wichtige listerielle Virulenzgene (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inIA*, *inIB*, *inIC* und *hpt*) die an diesem intrazellulären Lebenszyklus beteiligt sind, konnten in den letzten Jahren identifiziert und charakterisiert werden [74]. Diese Virulenzgene, die Faktoren kodieren, welche für eine erfolgreiche Invasion, für das Überleben innerhalb der Zelle und für die Ausbreitung im infizierten Organismus verantwortlich sind, sind größtenteils in einem Virulenzgencluster angeordnet (Abb.: 2.6) [74]. Dabei ist die koordinierte Expression dieses Virulenzgenclusters strikt abhängig von dem positiven pleiotropen Regulatorprotein PrfA („positiv regulatory factor A“), einem Mitglied der Crp/Fnr-Familie, das selbst Bestandteil des Virulenzgencluster ist. Eine *prfA*-negative Mutante zeigt keine Expression der genannten Virulenzgene und ist avirulent [44].

In Abwesenheit von PrfA werden diese Gene nicht [182, 203, 44], oder im Falle von *hly* nur schwach exprimiert [70]. Weiterhin stehen noch andere listerielle Gene unter der Kontrolle von PrfA, die auf dem Chromosom verteilt vorliegen. Hierzu zählen unter anderem die Internalingene *inIA*, *inIB* und *inIC* und das Gen *hpt* kodierend für den Hexosephosphattransporter [302]. Dabei gibt es strikt PrfA abhängige (Internalingen *inIC* kodiert für das kleine Internalin InIC von *Lm*), aber auch partiell abhängige Internalingene (*inIAB*-Operon) [76]. PrfA bindet wahrscheinlich als Dimer an die so genannte PrfA-Box, einer palindromischen 14 bp-Konsensus-Sequenz (5´-TTAACA NN TGTTAA-3´; NN=AA, TT), die nahe der Position -35 im Promotorbereich aller PrfA-abhängigen Gene vorhanden ist [84].

Das Virulenzgencluster ist eine 9,6 kb große chromosomale Region, die aus dem Gen *hly*, aus dem *plcA-prfA*-Operon und dem 5,7 kb großen Lecithinase-Operon besteht, wobei letzteres die Gene *mpl*, *actA*, *plcB* sowie zwei weitere offene Leseraster (Imo0206, Imo0207) enthält [302].

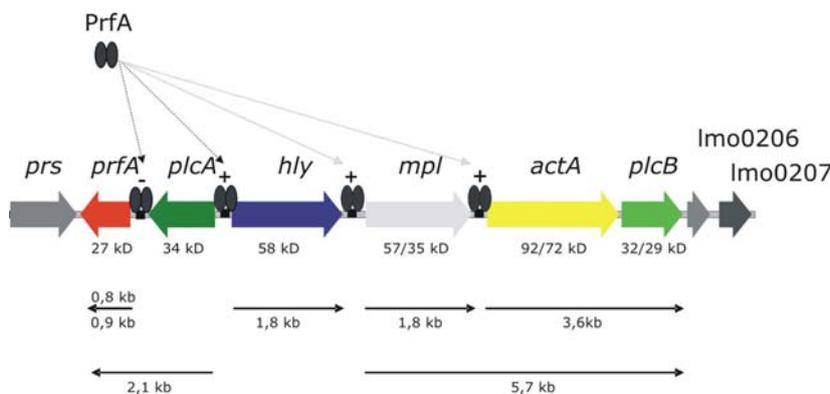


Abb. 2.6: Pathogenitätsinsel LIPI-1 von *Lm*. PrfA-Bindungs-boxen sind als schwarze Boxen dargestellt. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die bekannten Transkripte und die Molekulargewichte der kodierten Proteine (prozessierte/ unprozessierte Form) sind unterhalb der Gensymbole angezeigt.

Das Lecithinase-Operon ist nach der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (*plcB*) benannt, die auch als Lecithinase bezeichnet wird. Des Weiteren wird der gesamte Bereich von zwei Haushaltsgenen (*prs* und *ldh*) flankiert. Mittlerweile wird dieses Virulenzgencluster als *Listeria* Pathogenitätsinsel 1 (LIPI-1) definiert, da es eine kompakte Einheit darstellt und Merkmale einer Pathogenitätsinsel wie z.B. das Vorkommen in pathogenen Stämmen, große genomische DNA-Fragmente, Vorkommen oft mehrere Virulenzgene, distinkte genetische Elemente, Instabilität, aufweist [117, 302].

Die Gene, die von PrfA abhängig transkribiert werden, werden unterschiedlich reguliert. Allgemein wird dieser Regulator von Umweltsignalen stimuliert. Hitzeschockbedingungen induzieren die Expression einiger PrfA-abhängiger Gene, wohingegen niedrige Temperaturen zum Abschalten dieser Gene führen [27]. Andere Stressbedingungen, wie z. B. Nährstoffmangel, können ebenfalls den Regulator beeinflussen. Eisenmangel und eine hohe Osmolarität, Parameter, welche die Konditionen im Wirtsorganismus reflektieren, können verschiedene PrfA-abhängige Gene induzieren [168]. Ebenfalls beeinflusst das Nährstoffangebot die Genexpression. So können zum Beispiel Cellobiose und andere fermentierbare Zucker zu einer reduzierten Transkription der Virulenzgene führen [228, 207]. Weiterhin werden manche Gene dieses Regulons nur in bestimmten Stadien des Infektionszyklus exprimiert. *In vivo* zum Beispiel aktiviert PrfA überwiegend intrazellulär benötigte Virulenzgene wie *hly* oder *actA* [28, 212].

Somit besitzt *Lm* komplexe Regulationsmechanismen, um auf Umweltreize reagieren zu können. Damit kann die Expression seiner Virulenzgene über die Regulation von PrfA an die gegebenen Umstände angepasst werden.

2.3.1.5 Murine Listeriose als Modell für die zelluläre Infektabwehr

Listeria monocytogenes wird aufgrund von vielen Vorteilen, wie z. B. der relativ gefahrfreie Umgang mit diesem Pathogen, das schnelle Wachstum in konventionellen Bakterienmedien und vor allem wegen seines hoch reproduzierbaren Infektionsverlauf als verlässliches Modell für Infektionsstudien genutzt. Dabei dient die experimentelle Listeriose in der Maus, die 1962 von G. B. Mackaness eingeführt worden ist, als Prototyp eines Infektionsmodells [194].

Nach oraler Applikation in die Maus müssen Listerien als erste Hürde die angeborene chemische Infektabwehr, die Säure des Magens überstehen. Eine signifikante Anzahl an Bakterien wird durch die Säure des Magens zerstört [264]. Anschließend erreichen die verbleibenden Bakterien den Darm. Im Vergleich zur humanen Listeriose können die Listerien in das Darmepithel der Maus nicht aktiv invadieren. Sie scheinen aus dem Darmlumen in das Darmepithel einzutreten, indem sie mit Hilfe infizierter DCs aus den Peyer'schen Platten über das Darmepithel transloziert werden [200, 241]. Demnach invadieren Listerien nicht über die M-Zellen oder Enterozyten in das Darmepithel ein. Diese nicht aktive Invasion in das Darmepithel der Maus begründet sich in der spezies-spezifischen *Lm*-InIA/E-Cadherin-Interaktion. Das murine E-Cadherin kann nicht an *Lm*-InIA binden. Dies erklärt auch, warum Mäuse, im Vergleich zu anderen Infektionsmodellen, eine höhere orale Applikationsdosis (10^5) an Listerien benötigen. Damit ist auch die LD₅₀ bei BALB/c Mäusen, nach oraler Applikation relativ hoch ($> 10^9$ Bakterien), wohingegen die LD₅₀ bei BALB/c Mäusen nach intravenöser Applikation nur bei ca. 8×10^3 bzw. bei 10^4 nach Infektion von C57BL/6 Mäusen liegt.

Nach intravenösen Applikation konnte gezeigt werden, dass sich Listerien sehr schnell aus dem Blut in Milz und Leber ansammeln (zu 90%), wo sie sich im Falle der Leber vor allem in Hepatozyten vermehren (InIB-abhängige Invasion) [194]. Dort induzieren sie Apoptose, was zur Freisetzung von verschiedenen proinflammatorischen Faktoren führt und dies wiederum die Anlockung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) an die Orte der Infektion bewirkt [254]. Besonders IL-1 scheint chemotaktisch auf die Rekrutierung von PMNs zu wirken, da es die Sekretion der anderen Chemokine induziert [173, 172]. Es entstehen nun Mikroabzesse durch die Elimination von infizierten Hepatozyten [49] durch die listeriziden Eigenschaften [318] der aktivierten PMNs. Diese produzieren eine Reihe von Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 oder Chemokine wie MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2. Anschließend durchlaufen die infizierten Hepatozyten, unabhängig von der Infiltration durch die PMNs, ein Apoptoseprogramm [255]. Die aktivierten PMNs phagozytieren daraufhin freie Bakterien und apoptotische Hepatozyten. Nachfolgend werden diese mit Bakterien beladenen Neutrophilen von Leber-M \emptyset (Kupffer-Zellen) phagozytiert und verdaut. Damit kontrollieren die zugewanderten PMNs die akute Phase der *Listeria*-Infektion, werden aber zusätzlich von Kupffer-Zellen unterstützt [255]. Es konnte anhand von histologische Untersuchungen infizierter Lebern gezeigt werden, dass Listerien kurz nach der Infektion ausschließlich in ruhenden Kupffer-Zellen lokalisiert sind [51]. Innerhalb der ersten acht bis zwölf Stunden werden in der Leber 60-80% des intravenösen Inokulums inaktiviert [49].

In der Milz dagegen werden nur sehr wenige Listerien in den ersten 24 Stunden *p. I.* von Neutrophilen abgetötet [50]. Die Bakterien befinden sich anfänglich in den M \emptyset der Rinden-Sinus, die die Bakterien jedoch nicht an einer weiteren Ausbreitung hindern können. Die Infektion breitet sich dann in die Zone der weißen Pulpa aus, in der Listerien sowohl phagozytierende Zellen, als auch Parenchymzellen und Dendritische Zellen infizieren [48]. Vor kurzen wurden spezielle dendritische Zellen, so genannte TipDCs in infizierten Milzen gefunden, die eine Rolle in der angeborenen Immunität gerichtet gegen *Lm* haben. Diese scheinen an der Produktion von TNF- α und NO beteiligt zu sein, jedoch nicht am Priming von T-Zellen. TNF- α und NO sind zwei entscheidende Faktoren zur Kontrolle einer Listerien Infektion. Weiterhin zeigen TipDCs während einer Listerien Infektion eine gesteigerte Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle und der kostimulierenden Moleküle CD80, CD86 und CD40 auf ihrer Oberfläche [296].

Auch MyD88 („myeloid differentiation primary response protein 88“) - ein intrazelluläres Adaptorprotein, das viele TLR-vermittelte Signale weiterleitet - spielt in der angeborenen Immunität gegen *Listeria* eine essentielle Rolle [224]. Es wurde nachgewiesen, dass Mäuse, welche kein MyD88 mehr exprimieren, anfälliger für listerielle Infektionen sind, als zum Beispiel Mäuse, welche kein IFN- γ , oder IL-12 und IL-18 besitzen [269].

Ebenso ist die Interaktion zwischen M \emptyset und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) in der frühen Phase der Infektion wichtig. Die mit Listerien infizierten M \emptyset produzieren TNF- α und IL-12. Diese beiden Zytokine induzieren zusammen die Sekretion von IFN- γ aus NK-Zellen und die volle Aktivierung von M \emptyset , welche mit der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffintermediaten [300] und Stickoxide [210] antworten. Darüber hinaus führt die Aktivierung der M \emptyset zu ihrer phänotypischen Veränderung, d. h. MHC-Moleküle der Klasse-I und II werden verstärkt exprimiert. Mit Hilfe der MHC-Klasse-II-Moleküle werden T-Zellen phagozytierende und prozessierte Listerienantigene präsentiert. Diese Präsentation leitet die Mechanismen der spezifischen Abwehr ein. Zusätzlich wurde beobachtet, dass auch CD8 α ⁺ DCs aus der Milz, IFN- γ als Antwort auf eine *Listeria*-Infektion ausschütten [223].

Neben der Phagozytose durch MØ können auch DCs Listerien aufnehmen und eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und IL-18 produzieren [115, 163]. Ebenfalls werden DCs benötigt, um naive *Listeria*-spezifische zytotoxische T-Zellen primär zu stimulieren [292]. MØ dagegen können nur listerielle Peptide präsentieren [148].

Währenddessen replizieren und vermehren sich die verbleibenden Bakterien in Milz und Leber, bis eine maximale bakterielle Dichte im Zeitraum 48-72 h nach Infektion erreicht wird. Deshalb wird meistens in Infektionsversuchen am Tag 3 die Bakterienlast in den Organen bestimmt.

Im späteren Infektionsverlauf kommt es zu einem Wechsel von Neutrophilen zu einfließenden MØ und T-Lymphozyten [198]. Nur in Anwesenheit von T-Zellen, den Zellen der spezifischen Immunantwort kann eine vollständige Eliminierung der Listerien erreicht werden [224]. Nachweisbare Zahlen an Listerien-spezifischen T-Zellen werden vier bis fünf Tage nach einer Primärinfektion beobachtet und deren Proliferation geht mit einer starken Verringerung der Bakteriendichte einher. Für die Infektabwehr sind hauptsächlich CTLs und T_H1-Helferzellen verantwortlich. CD4⁺ T-Zellen sind beteiligt an der Rekrutierung von monozytären Zellen und der Isolierung eines infizierten Areals von anderen Gewebeteilen durch die Bildung von Granulomen [198, 127]. Da Listerien während der Infektion sowohl im Phagosom als auch im Zytosol von APCs vorkommen, werden listerielle Epitope von MHC-Klasse-Ia-Molekülen, MHC-Klasse-II-Molekülen und auch von MHC-Klasse-Ib-Molekülen H2-M3 präsentiert [224]. Die Präsentation listerieller Antigene (sehr oft bakteriell-exportierte Antigene) führt zu CD8⁺ wie auch CD4⁺ T-Zell-Aktivierungen. Dabei können CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen unabhängig voneinander Immunität vermitteln [243]. Dagegen zeigte eine andere Forschungsgruppe, dass die koordinierte Interaktion von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen für eine vollständige Immunantwort gegen *Lm* wichtig ist [272]. Durch die zelluläre Immunität werden die Erreger vollständig aus dem Wirt eliminiert und gleichzeitig werden T-Gedächtniszellen generiert, welche eine schnellere Immunantwort auf eine Sekundärinfektion auslösen können. CD8⁺ T-Zellen erkennen die dominanten listeriellen H2-K2-restringierten Epitope der exportierten Proteine p60 (Peptide 449-457, 217-225), LLO (91-99) und der Metalloprotease (Peptid 89-92) [39]. Trotz der Präsentation des LLO-Epitops auf infizierten APC in der niedrigsten Dichte, kann die größte Anzahl an spezifischen CD8⁺ T-Zellen generiert werden [225, 122, 40]. CD8⁺ T-Zellen wirken in einer *Listeria*-Infektion, indem sie die Apoptose durch einen Perforin-vermittelten Mechanismus oder aus einem Perforin- und Fas-unabhängigen Mechanismus, in welchen TNF- α involviert ist, in infizierten Hepatozyten auslösen [150]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunantwort kein IFN- γ benötigt [121]. Zwischen dem 5. und 7. Tag nach Infektion verringert sich die Bakterienanzahl in den Organen der Maus, bis sie als Ergebnis der zellulären Infektabwehr allmählich aus der Maus eliminiert sind [107].

Protektive Antikörper, gerichtet gegen *Lm*, wurden in einigen Studien beschrieben [75, 222]. Ochsenbein *et al.* zeigte auf, dass im Serum von naiven C57BL/6 Mäuse geringe, aber detektierbare Listerien-spezifische IgM Antikörper (Titer 1:16), jedoch keine IgG Antikörper aufzufinden waren [222]. Gleichfalls zeigten infizierte Mäuse (μ MT Mäuse), welche nicht zur Antikörperbildung fähig sind, keine natürliche IgM-Bildung, und außerdem war die listerielle Belastung in den Organen verschoben. Es waren fünf- bis zehnmal mehr Bakterien in Leber bzw. 79-mal weniger Bakterien in der Milz aufzufinden. Zudem konnte Edelson *et al.* beobachten, dass LLO-spezifische neutralisierende Antikörper eine Protektion gegen *Listeria* vermitteln [75]. Auch Untersuchungen

an SCID („severe combined immunodeficiency“)-Mäusen ergaben, dass in diesen Mäusen vermehrt gegen *Listeria* gerichtete Antikörper aufzufinden waren. Jedoch zeigten diese SCID-Mäuse nach Behandlung mit *Listeria*-spezifischen Antikörpern, eine chronische Listerien Infektion [23]. Demnach kann eine vollständige Eliminierung der Bakterien nur durch die Hilfe von T-Zellen erreicht werden.

2.3.1.6 Vorteile von *Listeria monocytogenes* als Impfstoffträger

Das Pathogen *Lm* ist aufgrund seiner intrazellulären Lebensweise und seiner Fähigkeit, das Immunsystem zu stimulieren und zu aktivieren, potenziell sehr gut als Überträger von heterologen Proteinantigenen in das Zytosol von immunologisch relevanten Wirtszellen, wie z. B. antigen-präsentierenden Zellen (APC) (Dendritische Zellen, Makrophagen), einsetzbar [184]. Als Gram-positives Bakterium besitzt es in seiner Zellwand kein Lipopolysaccharid (LPS). Bakterielle Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien wie *E.coli* spp. oder *Salmonella* spp., werden während einer Infektion sehr schnell und sehr früh im Infektionsverlauf freigesetzt und führen zu Krankheitssymptomen wie Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen oder bei ungünstigerem Verlauf der Krankheit zu einer toxischen Schockreaktion, dem häufig tödlichen Endotoxinschock [151]. Dies bleibt bei einer listeriellen Infektion aus. Zusätzlich besitzt *Lm* einen natürlichen Tropismus für APC [302]. Ebenso ist die Immunologie, gerichtet gegen *Lm*, sehr gut erforscht worden. Dieser Erreger, wie schon angegeben, induziert hauptsächlich durch seine LLO-vermittelte Fähigkeit, aus dem Phagosom zu entkommen, eine sehr starke zelluläre Immunität, in der vor allem CTLs und T_H1-Zellen eine Rolle spielen [224]. Aber nicht nur die systemische Infektabwehr wird aktiviert, sondern auch eine mukosale Immunantwort durch die orale Applikation dieser Bakterien. Auch die Tatsache, dass das Genom von *Lm* vollständig sequenziert wurde [100], erleichtert es, attenuierte Mutanten, die entweder Deletionen in Stoffwechselgenen oder in Virulenzgenen haben, herzustellen. Darüber hinaus sind schon viele geeignete virulenzattenuierte Stämme entwickelt und beschrieben worden, welche es erleichtern, *Lm* als potentiellen Vektor für den Transport von heterologen Proteinantigenen einzusetzen, ohne dass der Wirt ernsthaft erkrankt [136, 33, 186, 29]. Des Weiteren wurde *Lm* schon als Vektor für die Freisetzung von verschiedenen biologisch relevanten Molekülen wie z. B. Tumorantigene, bakterielle, virale oder auch parasitäre Antigene in unterschiedlichen Tiermodellen untersucht [136, 226, 281, 206, 280]. Zusätzlich schränkt die Virulenzattenuation der Erreger bzw. die antilisterielle Immunantwort nicht die Immunität, die gegen das heterologe Proteinantigen gerichtet ist, ein [283]. Schließlich konnten in klinischen Studien mit der virulenzattenuierten Doppelmutante $\Delta(act\ plcB)$, welche in Tiermodellen eine starke CTL-Antwort auslöste, keine nachteiligen Effekte für die Probanden nach einer oralen Infektion festgestellt werden [6, 59, 232]. Dies ist bis jetzt die einzige klinische Studie, in der mit einem virulenzattenuierten Erreger gleichzeitig eine humorale, mukosale und zelluläre Immunantwort in Probanden nachgewiesen wurde.

2.3.1.6.1 *Listeria*-spezifische Plasmide, welche die Übertragung von heterologen Proteinen ermöglichen

Für die Übertragung von heterologen Proteinantigenen wurden in vorangegangenen Arbeiten eine Reihe von unterschiedlichen *Listeria*-spezifischen Expressionsplasmiden (pSP-Plasmide) entwickelt

[235, 266]. Diese Plasmide besitzen zwei Replikationsursprünge und ein Antibiotika-Resistenzgen (entweder Erythromycin oder Tetrazyklin) zur Klonierung und Vermehrung in Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* und in Gram-positiven Bakterien wie *Lm*. Zusätzlich konnte durch die Einführung einer Expressionskassette eines essentiellen *Lm*-Gens, welches für die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase (*trpS*) kodiert, die 100%ige Stabilität der Plasmide in einem *trpS*-defizienten *Lm* Stamm *in vivo* erreicht werden („balanced lethal plasmid System“) [233, 235]. Diese verschiedenen Plasmide ermöglichen es, heterologe Proteinantigene in Form von bakteriell-exprimierten Proteinen, von DNA oder listeriell transkribierte mRNA in Wirtszellen zu übertragen (Abb.: 2.7, A; B; C1 u. C2). Nachfolgend sind diese unterschiedlichen Transfer-Strategien mit den dazugehörigen Plasmiden beschrieben.

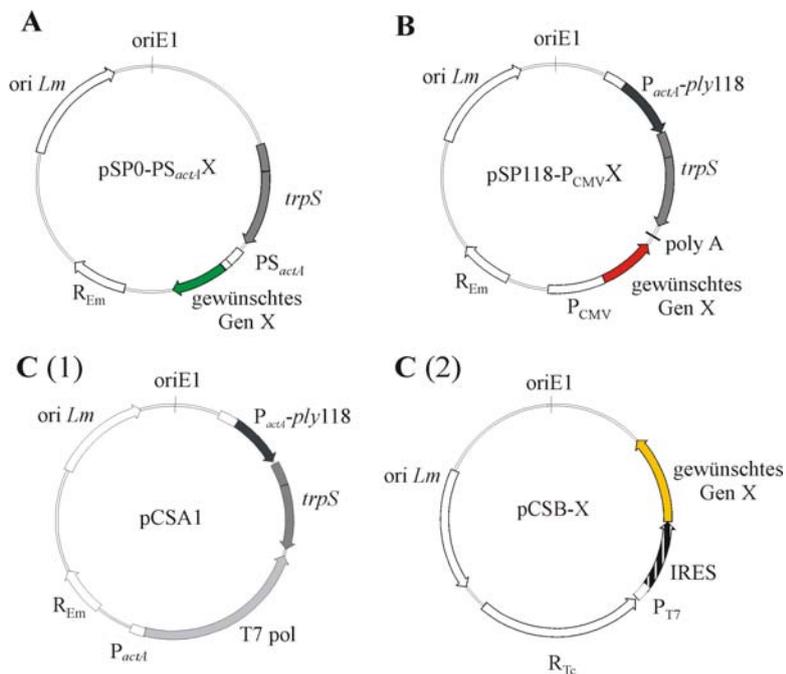


Abb. 2.7: *Lm*-spezifische Expressionsplasmide zur Übertragung von (A) bakteriell exprimierten und exportierten Proteinen in das Zytosol von Wirtszellen, (B) für die Expression einer cDNA („coding DNA“) unter der Kontrolle des CMV Promotors mit anschließender Übertragung in den Wirt und (C) ein Zwei-Plasmid-System für die Transkription einer mRNA durch Listerien mit anschließender Translation der freigesetzten mRNA durch die Wirtszellen vermittelt durch das IRES- („internal ribosomal entry site“) Element. Plasmide B und C(1) enthalten eine Endolysinexpressionskassette (P_{actA}-ply118) spezifisch für *Lm*, welche die Autolysis der Bakterien

im Zytosol der Wirtszellen vermittelt. C(1) Plasmid pCSA1 kodiert für eine T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des P_{actA} und das Plasmid pCSB-OVA (C(2)) kodiert die *ova* mRNA-Expressionskassette unter der Kontrolle des T7-Promotors. *trpS*, Gen, das für die *Lm* Tryptophanyl-tRNA-Synthetase kodiert; R_{Em}, Erythromycin-Resistenzgen; R_{Tc}, Tetrazyklin-Resistenzgen; ori_{Lm}, Replikationsursprung für *Lm*; oriE1, Replikationsursprung für *E. coli*; PS_{actA}, Promotor und Signalsequenz des *actA*-Gens; *ova*, verkürzte Sequenz des ovalbumin-Gens; poly A, Polyadenylierungssequenz.

Heterologe Proteine, die von *Lm* selbst exprimiert werden stehen unter der Kontrolle eines *in vivo* aktiven *Lm*-Promotors. Unsere Gruppe verwendete den hauptsächlich im Phagosom aktiven *hly*-Promotor bzw. den hauptsächlich im Wirtszellzytosol aktiven *actA*-Promotor. Zusätzlich können die Antigene über die bakterielle Zellwand in das Zytosol oder ins Phagosom der Wirtszelle exportiert werden, wenn die entsprechende Signalsequenz an die gewünschten Gene der heterologen Antigene fusioniert wurden (Abb.: 2.7, A). Zusätzlich wurden Expressionsplasmide entwickelt, welche für eine Expressionskassette kodieren, in der die Ankersequenz des *inlA*-Gens an das 3'-Ende der gewünschten Antigensequenz fusioniert wurde [265]. Demnach können Listerien nach Expression des Antigens und nach signalpeptidabhängiger-Ausschleusung über die Zytoplasmamembran, dieses in ihrer eigenen bakteriellen Zellwand verankern. Auch diese

Expressions-kassetten wurden unter die Kontrolle des *actA*- oder des *hly*-Promotors gestellt. Vorangegangene Studien mit den Reporter-gen EGFP belegten eine Verankerung und auch eine Sekretion des EGFPs durch die Listerien [265].

Allgemein werden bakterielle Proteine, welche in das Phagosom freigesetzt werden, nach Degradation in Peptide über den MHC-Klasse-II Moleküle den CD4 T-Zellen präsentiert. Dagegen werden bakterielle Proteine, welche in das Zytosol freigesetzt werden, nach Degradation im Proteasom über MHC-Klasse-I-Molekülen den CD8 T-Zellen präsentiert [141]. Der Prozess der bakteriellen Übertragung von exportierten Proteinantigenen („Protein-Delivery“) in das Phagosom oder ins Wirtszellzytosol ist schematisch in Abb.: 2.8 dargestellt.

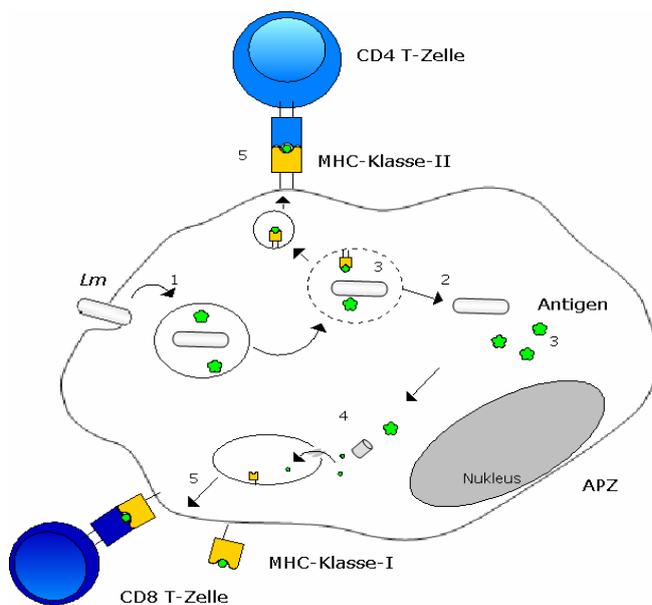


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Übertragung von bakteriellexprimierten Proteinantigenen durch *Lm* („Protein-Delivery“) und deren Präsentation.

1. Eindringen in die Wirtszelle
2. Freisetzung der Bakterien aus dem Phagosom
3. Expression und Export des Antigens ins Phagosom oder ins Zytosol
4. Prozessierung des Antigens
5. Präsentation der prozessierten Epitope über MHC-Klasse I oder II an CD8 oder CD4 T-Zellen

Die zweite Strategie, die zur Übertragung von heterologen Proteinantigenen verwendet wird, ist die „DNA-Delivery“ Strategie (Abb.: 2.9, A). Hierbei setzen Listerien Plasmid-DNA frei, welche das gewünschte Protein als cDNA unter der Kontrolle des starken eukaryotischen Zytomegalievirus „immediate early“ Promotors (P_{CMV}) kodiert. Zur Stabilisierung der mRNA wird eine Polyadenylierungssequenz verwendet (Abb.: 2.7, B).

Die Freisetzung der Plasmid-DNA resultiert schließlich in der Expression des Antigens durch die infizierte Wirtszelle. Die Freisetzung kann dabei durch induzierte Autolysis der Trägerbakterien erfolgen. In vorangegangenen Arbeiten zu dieser Arbeit wurde eine plasmidkodierte Autolysis entwickelt, die von einem *Listeria*-spezifischen Endolysin (Ply118, *ply118*) des Phagen A118 durchgeführt wird [67]. Diese autolysierenden Listerien exprimieren das Ply118 unter der Kontrolle des vor allem im Zytosol aktiven *Lm*-Promotors des *actA*-Gens (P_{actA}) (Abb.: 2.7, B) [67]. Sobald sich die Listerien ins Zytosol befreit haben, wird der *actA*-Promotor der Expressionskassette des Ply118 aktiv, das Endolysin wird exprimiert und die Zerstörung der bakteriellen Zellwand wird induziert (Abb.: 2.9, A)

Es konnte eine effiziente Freisetzung von Plasmid-DNA unter der Verwendung dieser autolysierenden, virulenzattenuierten *Lm* Stämmen mit nachfolgender Expression und Antigenpräsentation durch APC wie murine Makrophagen oder murine und humane dendritische

Zellen demonstriert werden [67, 235]. Auch in nicht phagozytischen Zellen zeigte sich eine 5-20 % gesteigerte EGFP-kodierende Plasmid-DNA Übertragung durch autolysierende Stämme. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Baktofektionseffizienz, das heißt die Übertragung der Plasmid-DNA, stark abhängig von der jeweiligen Zelllinie war [235]. Antigenpräsentierende Zellen, welche autolysierende *Listerien* phagozytieren, die Plasmid-DNA ins Zytosol übertragen, können das Antigen, welches auf dem Plasmid kodierend vorliegt, exprimieren. Dies resultiert schließlich in der Präsentation des prozessierten Antigens über MHC-Klasse-I-Moleküle den CD8 T-Zellen (Abb.: 2.9, A) [67, 266].

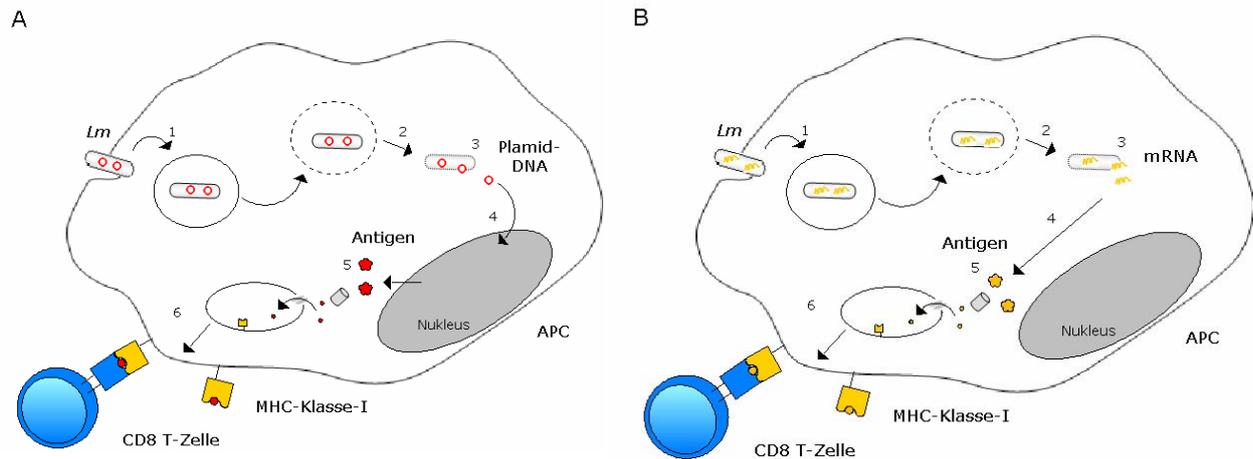


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der Übertragung von Plasmid-DNA und mRNA durch *Lm* („DNA- und RNA-Delivery“) und die Präsentation der Antigene.

1. Eindringen in die Wirtszelle
2. Freisetzung der Bakterien aus dem Phagosom
3. Autolysis des Bakteriums und Freisetzung der Plasmid-DNA (A) oder der transkribierten mRNA (B) ins Zytosol der Wirtszelle
4. Transport der Plasmid-DNA in den Nucleus und anschließend Expression durch den Wirt (A) oder Translation der prozessierten mRNA durch den Wirt (B)
5. Prozessierung des Antigens durch den Wirt
6. Präsentation der prozessierten Epitope über MHC-Klasse I an CD8 T-Zellen

Die dritte Strategie zur Übertragung von heterologen Proteinantigenen wurde kürzlich in unserer Gruppe entwickelt. Es wurden *Lm* Stämme konstruiert, die ein Zwei-Plasmid-System enthalten (Abb.: 2.7, C) [266]. Das erste Expressionsplasmid ist ein pSP-Derivat, welches für eine T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *actA*-Promotors kodiert (Abb.: 2,7 C1). Auf dem zweiten Plasmid liegt die Antigenexpressionskassette. Dabei steht diese unter der Kontrolle des T7-Promotors und zusätzlich ist das Gen des gewünschten Antigens mit einem IRES- („internal ribosomal entry site“) Element des Enzephalomyocarditisvirus fusioniert, so dass es zu einer 5'-Cap unabhängigen Translation durch den Wirt kommt (Abb.: 2.7, C2). Durch dieses Zwei-Plasmid-System wird gewährleistet, dass *Lm* die plasmidkodierte mRNA („messenger RNA“) unter der Kontrolle des T7 Promotors funktionell transkribiert. Anschließend wird die transkribierte mRNA durch die plasmidkodierte Ply118-vermittelte Autolysis in den infizierten Wirtszellen freigesetzt, so

dass dieser die mRNA translatieren können. Dadurch wird ermöglicht, das nun das exprimierte Antigen, welches von der mRNA kodiert wurde, im Zytosol proteasomisch degradiert und prozessiert wird. Nun können die prozessierten Antigenpeptide über MHC-Klasse-I-Moleküle den CD8-T-Zellen präsentiert werden (Abb.: 2.9, B).

Diese „RNA-Delivery“ genannte Strategie zeigte eine schnellere und auch bessere Übertragung des gewünschten heterologen Proteins (EGFP) in Wirtszellen wie z.B. murine oder auch in humanen dendritische Zellen als durch die Übertragung der Plasmid-DANN [267]. Auch die Präsentation eines Antigens durch murine Makrophagen konnte effizienter nach RNA-Delivery als nach DNA-Delivery *in vitro* nachgewiesen werden.

2.3.1.7 Der *Lm*-spezifische Bakteriophage A118

Der Listerien-spezifische Bakteriophage wurde erstmals 1990 von Loessner und Busse beschrieben [188]. Der Phage A118 gehört zu den Siphoviridae (doppelsträngige Phagen) und ist spezifisch für listerielle Serovare 1/2. Dieser Phage besteht aus einem langen flexiblen Schwanz und besitzt ein isometrisches Capsid. A118 adsorbiert an die Bakterienzelle durch einige Teichonsäurenbestandteile wie z. B. Glukosamin oder Rhamnose [307].

Phagenlysine (Endolysine) des A118 sind 30,8 kD große, sehr spezifische Zellwandhydrolyse-Enzyme, welche eine L-Alanoyl-D-Glutamat-Spezifität besitzen [191]. Die Expression dieser Endolysine (Ply118) beginnt in der späten Genexpression des Phagengenoms. Die Aktivität der Endolysine ist dabei abhängig von dem Transport über die bakterielle Zytoplasmamembran, was ihnen durch die Aktivität eines porenformenden Proteins, des Holins ermöglicht wird [316]. Demnach lysiert der Phage das Bakterium durch die Kombination der Funktionen des Holins und des Lysins. Phagenlysine können in kürzester Zeit den bakteriellen Mureinsacculus vollständig degradieren, wodurch die neu generierten Phagen aus den Bakterien freigesetzt werden.

Außerdem besitzen Phagenlysine eine enzymatisch aktive Domäne in den 140 Aminosäuren der N-terminalen Region, während die C-terminalen 182 Aminosäurereste die Bindung an einen polar verteilten, aber nicht identifizierten Liganden in der bakteriellen Zellwand vermitteln [190]. Das Phagenlysin Ply118 scheint andere Bakterien nicht zu lysieren und kann daher in *E. coli* überexprimiert werden [191].

Wie schon angesprochen, lysiert der Phage das Bakterium durch eine Kombination aus Endolysin und Holin. Das Holin selbst ist ein 10,1 kD großes Protein, dessen cDNA (hol118) hochkonservierte Sequenzen besitzt [191]. Des Weiteren liegt eine Besonderheit im Phagengenom vor: ein translationales Coupling der zwei Gene: *hol118* und *ply118* [189]. Das heißt, dass die letzte Base des *hol118* mit dem Startcodon des *ply118* überlappt. Demnach werden diese zwei Gene immer zusammen abgelesen und das wiederum spiegelt die direkte Abhängigkeit der beiden wieder. Zusätzlich kontrolliert das Holin den Erfolg des Lysins, da das Holin die Länge des Infektionszyklus bestimmt. Dies kann es bewerkstelligen, da ein „dual-start-motif“ in der kodierenden Sequenz des *hol118* vorliegt. Es werden zwei Translationsprodukte verschiedener Längen exprimiert [305]. Das lange Produkt kodiert dabei das eigentliche porenformende Enzym (Holin), das kürzere den Inhibitor des Holins. Dieser Inhibitor formt mit dem Holin Heterooligomere, die solange in der Zytoplasmamembran eingelagert sind, bis es zu einer Aktivierung des Holins kommt. Welche Mechanismen für die Aktivierung des Holins verantwortlich sind, sind bis jetzt noch unbekannt. Man

nimmt an, dass durch eine Depolarisierung der Membran das Holin aktiviert wird [111, 305]. Anschließend kommt es zu einer Homooligomerisierung des Holins, was wiederum zur Lochbildung führt und dies letztendlich das angereicherte Lysin im Inneren der Zelle nach außen bringt.

2.4 Ziel dieser Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war, neuartige Impfstoffstrategien unter der Verwendung des Gram-positiven Bakteriums *Listeria monocytogenes* (*Lm*) als Überträger für heterologe Proteinantigene am Beispiel von Ovalbumin, in die Maus, zu untersuchen.

Dabei sollte untersucht werden, ob durch die Übertragung des plasmidkodierten Ovalbumins in Form von bakteriell exprimierten und exportierten Proteinen, von cDNA oder mRNA durch die jeweiligen *Lm* $\Delta trpS$ Trägerstämme in das Zytosol von antigenpräsentierenden Zellen eine effiziente MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-restringierte Präsentation induziert wird. Anschließend soll diese Antigenpräsentation eine Erkennung, Aktivierung und Proliferation von OVA-spezifischen CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen induzieren, so dass letztendlich auch eine entsprechende zelluläre adaptive Immunantwort mit gegen Ovalbumin gerichteten T-Gedächtniszellen generiert wird. In diesem Zusammenhang sollte neben der Effizienz der *Lm* $\Delta trpS$ Deletionsmutante als Überträger von Ovalbumin auch die Effizienz anderer neuentwickelter Deletionsmutanten ermittelt werden. Anschließend sollte unter der Verwendung eines weiteren Modellantigens aus dem murinen Zytomegalievirus (mCMV) der wirkliche Impferfolg, der Schutz gegen den Krankheitserreger mCMV, durch Verwendung dieser listeriellen Impfstoffstrategien getestet werden.

Ebenfalls sollte untersucht werden, auf welcher Art und Weise das Antigen von den Bakterien exprimiert (exportiert, zellwandverankert oder intrazellulär verbleibend) und in welchem Kompartiment der Wirtszelle dieses Antigen übertragen werden soll, damit eine effiziente MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-restringierte Antigenpräsentation *in vivo* induziert werden kann. Letztendlich sollte diese Antigenpräsentation auch zu einer adaptiven Immunantwort führen.

Weiterhin sollten zusätzliche Deletionen in bekannten Virulenzgenen von *Lm* in den Ausgangsstamm *Lm* $\Delta trpS$ des „balanced lethal plasmid systems“ eingeführt werden, damit diese neuen Mutanten auf ihre Eignung als Impfstoffträger in späteren *in vivo* Anwendungen charakterisiert werden können.

Abschließend sollten neue alternative Lysiskassetten mit dem porenformenden Holin des Phagen A118 entwickelt werden, die es ermöglichen die Effizienz der Plasmidfreisetzung aus *Lm* zu erhöhen.

KAPITEL 3

Material

3.1 Bakterienstämme

| Bezeichnung | Beschreibung | Herkunft |
|--|---|------------------------|
| <i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta trpS$ / pflotrps | $\Delta trpS$ pflotrps | Pilgrim et al. |
| <i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta(trpS actA)$ / pflotrps | $\Delta trpS \Delta actA$ pflotrps | Pilgrim et al. |
| <i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta(trpS actA inlB)$ / pflotrps | $\Delta trpS \Delta actA \Delta inlB$ pflotrps | diese Arbeit |
| <i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta(trpS inlA)$ / pflotrps | $\Delta trpS \Delta inlA$ pflotrps | A. Frentzen |
| <i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta(trpS inlA inlB)$ / pflotrps | $\Delta trpS \Delta inlA \Delta inlB$ pflotrps | diese Arbeit |
| <i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta(trpS inlB)$ / pflotrps | $\Delta trpS \Delta inlB$ pflotrps | diese Arbeit |
| <i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta(trpS aroA aroB)$ / pflotrps | $\Delta trpS \Delta aroA \Delta aroB$ pflotrps | Stritzker et al. |
| pflotrps | $\Delta trpS \Delta aroA \Delta aroB \Delta inlB$ pflotrps | diese Arbeit |
| <i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta(trpS aroA aroB inlB actA)$ / pflotrps | $\Delta trpS \Delta aroA \Delta aroB \Delta inlB \Delta actA$ pflotrps | diese Arbeit |
| <i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta trpS hlyW491A$ / pflotrps | $\Delta trpS hlyW491A$ pflotrps | S. Pilgrim |
| E. coli K12 DH10b | F ⁻ mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ endA1 recA1, deoR $\Delta(ara, leu)7697$ araD139, galU galK nupG rps λ ⁻ | Fa. Invitrogen (Gibco) |
| E. coli K12 DH5 α | F ⁻ $\Phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 endA1 recA1 hsdR17 (r _K ⁻ m _K ⁺) deoR thi-1 phoA supE44 λ ⁻ gyrA96 relA1 | Fa. Invitrogen (Gibco) |

3.2 Plasmide

| Bezeichnung | Merkmale | Herkunft |
|-----------------------------|---|----------------|
| pCI-OVA | Ursprungsplasmid für Ovalbumin | J. Fensterle |
| pEMBL19-IE1 | Ursprungsplasmid für IE1 | W. Brune |
| pflotrps | pflo $\times trpS$ (SalI) | S. Pilgrim |
| pSP0 | pUNK1 $\times trpS$ (SalI) | Pilgrim et al. |
| pSP0-PS _{actA} OVA | pSP0 $\times (PS)_{actA-ova-T_{inlA}}$ | C. Schoen |
| pSP0-PS _{hly} OVA | pSP0 $\times (PS)_{hly-ova-T_{inlA}}$ (PstI, SacI) | C. Schoen |
| pSP0-P _{actA} OVA | pSP0 $\times P_{actA-ova-T_{inlA}}$ (PstI, SacI) | diese Arbeit |
| pSP0-P _{hly} OVA | pSP0 $\times P_{hly-ova-T_{inlA}}$ (PstI, SacI) | diese Arbeit |
| pSP0-PS _{actA} IE1 | pSP0 $\times (PS)_{actA-ie1-T_{inlA}}$ (PstI, SacI) | diese Arbeit |

| | | |
|--|--|-----------------------|
| pSP118 | pUNK1 P _{actA} -ply118 × trpS (SalI) | diese Arbeit |
| pSP118- PS _{actA} OVA | pSP118 × (PS) _{actA} -ova-T _{inIA} (PstI, SacI) | diese Arbeit |
| pSP118- PS _{hly} OVA | pSP118 × (PS) _{hly} -ova-T _{inIA} (PstI, SacI) | diese Arbeit |
| pSP118- P _{actA} OVA | pSP118 × P _{actA} -ova-T _{inIA} (PstI, SacI) | diese Arbeit |
| pSP118- P _{hly} OVA | pSP118 × P _{hly} -ova-T _{inIA} (PstI, SacI) | diese Arbeit |
| pSP118- PS _{actA} IE1IE1 | pSP118 × (PS) _{actA} -ie1-T _{inIA} (PstI, SacI) | diese Arbeit |
| | | |
| pSP0-P _{cmv} | pUNK-Pcmv × trpS (SalI) | Pilgrim <i>et al.</i> |
| pSP0-P _{cmv} EGFP | pSP0-Pcmv × egfp (NotI) | Pilgrim <i>et al.</i> |
| pSP0-P _{cmv} Ova | pSP0-Pcmv × ova (NotI) | diese Arbeit |
| pSP0-P _{cmv} IE1 | pSP0-Pcmv × ie1 (NotI) | diese Arbeit |
| | | |
| pSP118-P _{cmv} | pUNK-Pcmv P _{actA} -ply118 × trpS (SalI) | Pilgrim <i>et al.</i> |
| pSP118-P _{cmv} EGFP | pSP118-Pcmv × egfp (NotI) | Pilgrim <i>et al.</i> |
| pSP118-P _{cmv} OVA | pSP118-Pcmv × ova (NotI) | diese Arbeit |
| pSP118-P _{cmv} IE1 | pSP118-Pcmv × ie1 (NotI) | diese Arbeit |
| | | |
| pCSA1 | pSP118 × P _{actA} -polT7 | Schoen <i>et al.</i> |
| pCSB1 | pFLO × PT7-ires _{EMCV} -ova-T _{T7} (Cfr9I, NotI) | C. Schoen |
| pCSB7 | pFLO × PT7-ires _{EMCV} -ova-T _{T7} (Cfr9I, NotI) | Schoen <i>et al.</i> |
| pCSB-IE1 | pFLO × PT7-ires _{EMCV} -ie1-T _{T7} (Cfr9I, NotI) | diese Arbeit |
| | | |
| pUNK-ply118 | pUNK× ply118 | S. Pilgrim |
| | | |
| pSK-IRESIE1 | pSK × ires _{EMCV} -ie1(NotI, Cfr9I) | diese Arbeit |
| | | |
| pUC18-IE1 | pUC18-(PS) _{actA} T _{inIA} × ie1 (NsiI) | diese Arbeit |
| pUC18-PS _{actA} OVA | pUC18× (PS) _{actA} -ova-T _{inIA} (PstI, SacI) | C. Schoen |
| pUC18-PS _{hly} OVA | pUC18× (PS) _{hly} -ova-T _{inIA} (PstI, SacI) | C. Schoen |
| pUC18- P _{actA} OVA | pUC18-T _{inIA} × P _{actA} ova (XbaI, NsiI) | diese Arbeit |
| pUC18-P _{hly} OVA | pUC18-T _{inIA} × P _{hly} ova (XbaI, NsiI) | diese Arbeit |
| | | |
| pLSV1- Δ inlB ₆₋₆₂₇ (Δ inlA ₃₋₇₉₈) | pLSV1 × Δ inlB ₆₋₆₂₇ (Δ inlA ₃₋₇₉₈) (BamHI, EcoRI) | A. Frentzen |
| pLSV1- Δ inlB ₆₋₆₂₇ (WT) | pLSV1 × Δ inlB ₆₋₆₂₇ (WT) (BamHI, EcoRI) | A. Frentzen |
| pISV1-actA | pLSV1 × actA (BamHI, EcoRI) | S. Pilgrim |
| | | |
| pSP14-P _{CMV} EGFP2 | pSP0-PcmvEGFP2 × P _{actA} -hol118 (Cfr9I) | diese Arbeit |
| pSP15-P _{CMV} EGFP2 | pSP0-PcmvEGFP2 × P _{actA} -holply118 (Cfr9I) | diese Arbeit |
| pSP16-P _{CMV} EGFP2 | pSP0-PcmvEGFP2 × P _{hpt} -hol118 (Cfr9I) | diese Arbeit |
| pSP17-P _{CMV} EGFP2 | pSP0-PcmvEGFP2 × P _{hpt} -holply118 (Cfr9I) | diese Arbeit |

3.3 Oligonukleotide

Die jeweiligen Restriktionserkennungssequenzen sind unterstrichen.

| Bezeichnung | Sequenz |
|--------------------------|---|
| 3' ova C-Terminus (NsiI) | 5' ctt tct <u>tat gca</u> taa ggg gaa ac-3' |
| 7 RNAP screen | 5' - gct tgc cgc gct tag ctt tc-3' |
| actA-1 | 5' -atc aag cgg ctc ata tga aag-3' |
| actA-2 | 5' -tcc ctt ctc ggt aat cag tca-3' |
| ActA-2 reverse | 5' - gcg tat cac gag gag gga gta taa-3' |
| aroA test 1 | 5' - ctg ctg gtg gat ttg tag atg-3' |
| aroA test 4 | 5' - aaa cta ctg gtg ctg gag aac -3' |
| aroB test 2 | 5' - gaa tga cca atg gta tgc caa-3' |
| aroB test 3 | 5' - tta ccg atg taa gtt gct cac-3' |
| deltainlAB-1 | 5' -ggg tga tga tat aga aga ag-3' |

| | |
|-----------------|---|
| deltainIAB-2 | 5'-ttg cta aaa ggg atg tgt gtc tg-3' |
| deltainIbcheck | 5'-att agc agt agg aac tgc aat gg-3' |
| hol(a) | 5'-act cca ttt cta tca tgg atc ctc cct cct cgt gat ac-3' |
| hol(b) | 5'-gta tca cga gga ggg agg atc cat gat aga aat gga gt-3' |
| hol(hpt/a) | 5'- actcca ttt cta tca tgg atc cta taa ttt tcc ttt ca-3' |
| Hol(hpt/b) | 5'-tga aag gaa aat tat agg atc cat gat aga aat gga gt-3' |
| hol(R) | 5'-aat aac ccc ggg tta ttt atc atc ctc tcc a-3' |
| IE1(NotI)-for | 5'-aaa aaa gcg gcc gct cgc cac cat gga gcc cgc cgc acc cag ttg c-3' |
| IE1(NotI)-rev | 5'-aaa aaa gcg gcc gct cac ttc ttg ctc ttc ttc ttg ggc tgc tgt tga ttc tca g-3' |
| IE1(NsiI)-for | 5'-ttt gca gat qca ttc gag ccc gcc gca ccc agt-3' |
| IE1(NsiI)-rev | 5'-tct atq cat ctt ctt gct ctt ctt ctt ggg-3' |
| IE1-IRES | 5'-ggg tgc ggc ggg ctc cat ggt tgt ggc cat att-3' |
| IE1-NotI-rev | 5'-aaa aaa gcg gcc gct cac ttc ttg ctc ttc ttc-3' |
| IRES-(XmaI)-for | 5'-gaa ttg ccc ggg atc cgc ccc tct ccc tcc-3' |
| IRES-IE1 | 5'-aat atg gcc cac aac cat gga gcc cgc cgc acc c-3' |
| oriE1checkfor | 5'-gcg aaa ccc gac agg act at-3' |
| Ova(a) | 5'-ccc agg aat tga tga gct cct tga ata cat ca-3' |
| Ova(b) | 5'-tga tgt att caa gga gct cat caa ttc ctg gg-3' |
| Ova(R) | 5'-aaa aaa gcg gcc gct taa ggg gaa aca cat ctg c-3' |
| Ova2(F) | 5'-aaa aaa gcg gcc gcg cca cca tgg gct cca tcg gcg cag caa gca tgg aat tt-3' |
| ovacheckfor | 5'-cct tca gcc aag ctc cgt gga-3' |
| ovacheckrev | 5'-gac gct tgc agc atc cac tcc-3' |
| PactA(F) | 5'-aaa aat ccc ggg tta ccg atg cga aaa aag c-3' |
| PactA(PstI) | 5'-gga att gat gaa ctg cag cca ctt ata ctc cct cct cgt gat-3' |
| PactA(XbaI) | 5'-gct tgt cta qaa gtt ggg gtt aac tg-3' |
| Phly(PstI) | 5'-gga att gat gaa ctg cag tca tgg gtt tca ctc tcc ttc tac-3' |
| Phly(XbaI) | 5'-gat tag tat cta gat atc tta aag tga c-3' |
| Phpt(Cfr9I) | 5'-aaa gga ccc ggg aat tat ttg gga agc cca-3' |
| ply(R) | 5'-gag ggc ccc ggg cta aat ctt ttt aac aaa c-3' |
| ply118up1 | 5'-cca acc aca gac tct cta tt-3' |
| trpS 1b | 5'-gga tga tag ctt cct tct atc-3' |
| trpS 4b | 5'-act gcc ttc aat tact cg att-3' |

3.4 Eukaryotische Zelltypen

- Caco-2

Zelltyp: humanes Kolonkarzinom.

Herkunft: wurde 1974 aus einem primären Darmtumor (adenocarcinoma) isoliert.

Kulturmedium: 1640 RPMI + L-Glutamin/ 10 % inaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) ohne Zusätze.

Zelllinie wurde für EGFP-Expressionsstudien, Invasionsassays und Adhärenz-Versuche verwendet.

- Cos-1

Zelltyp: Fibroplasten-ähnlich; Nierenzellen aus der grünen Meerkatze.

Herkunft: die Etablierung von COS-Zelllinien wurde 1981 publiziert. Dabei wurde eine etablierte Nierenzelllinie von Grünen Meerkatzen (CV-1-Zelllinie), die für die Vermehrung des SV40-Virus permissiv ist, mit einer SV40-Mutante transfiziert.

Kulturmedium: 1640 RPMI + L-Glutamin/ 10 % (v/v) FKS ohne Zusätze.

Zelllinie wurde für EGFP-Expressionstudien und Invasionsassays verwendet.

- HEP-G2

Zelltyp: humane Leberzelllinie.

Herkunft: wurde 1975 aus dem Tumorzellgewebe eines 15-jährigen argentinischen Jungen isoliert.

Kulturmedium: 1×Minimal Essential Medium pH 7,3 mit 10 % (v/v) FKS, 1×MEM-nichtessentielle-Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 0,15 % (v/v) Natriumbicarbonat, (0.2µm).

Zelllinie wurde für EGFP-Expressionstudien verwendet.

- HELA

Zelltyp: humanes Zervix-Karzinom, epithelartig.

Herkunft: die Zellen, die aus einem Zervix-Karzinom einer Patientin 1951 isoliert wurden, sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur etabliert wurde. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, Henrietta Lacks, zurück.

Kulturmedium: 1640 RPMI + L-Glutamin/ 10 % (v/v) FKS ohne Zusätze.

Zelllinie wurde für EGFP-Expressionstudien verwendet.

- P-388.D1

Zelltyp: Monozyten-Makrophagen aus der Maus

Herkunft: wurden ursprünglich 1956 aus einem Methylchloranthreninduzierten Tumor der DBA/2 Maus (Haplotyp H-2^d) isoliert.

Kulturmedium: 1640 RPMI + L-Glutamin/ 10 % (v/v) FKS ohne Zusätze.

Zelllinie wurde für EGFP-Expressionstudien, Invasionsstudien und Replikationsassays verwendet.

- J774

Zelltyp: Monozyten-Makrophagen aus der Maus

Herkunft: wurden ursprünglich 1968 aus einem Tumor der BALB/c Maus (Haplotyp H-2^d) isoliert.

Kulturmedium: 1640 RPMI + L-Glutamin/ 10 % (v/v) FKS ohne Zusätze.

Zelllinie wurde für Invasionsstudien und Replikationsassays verwendet

3.5 Versuchstiere

Für Immunisierungs-Experimente wurden folgende 6 Wochen alte, weibliche Mäuse verwendet:

- C57BL/6 Mäuse

C57BL/6NCrI der Fa. Charles River
C57BL/6JOlaHsd der Fa. Harlan Winkelmann

Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2K^b.

- BALB/c Mäuse

BALB/cAnNCrI der Fa. Charles River
BALB/cOlaHsd und der Fa. Harlan Winkelmann

Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2K^d.

Selbst gezüchtete transgene OT-I Mäuse und OT-II Mäuse wurden in den adoptiven Transfer Experimenten eingesetzt.

- OT-I

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zellrezeptor (TCR), der das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ im Kontext von MHC-Klasse I H2-K^b erkennt [130]. Der TCR kann spezifisch mit den mAb anti-Maus Vα2 und Vβ 5.1, 5.2 TZR nachgewiesen werden.

- OT-II

Diese Mäuse exprimieren die α- und β-Ketten des T-Zellrezeptors spezifisch für die Ovalbumin Aminosäureabfolge 323-339, komplexiert mit MHC-Klasse-II Molekül II I-A². Der

TCR kann spezifisch mit den monoklonalen Antikörper anti-Maus Va2 und V β 5.1, 5.2 TZR nachgewiesen werden.

- DO11.10

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zellrezeptor, der das Peptid OVA323-339 im Kontext von MHC-Klasse II I-Ad erkennt [218]. Der TCR kann spezifisch mit dem monoklonalen Antikörper anti-Maus DO11.10 TZR nachgewiesen werden.

Alle Tiere wurden nach den Richtlinien der Regierung Unterfrankens Spezies- und Stammgerecht untergebracht, gepflegt und ggf. erforderlich medizinisch versorgt.

3.6 Geräte

In nachfolgender Tabelle sind alle Geräte aufgelistet, die während der Arbeit eingesetzt wurden

| Artikel | Firma | Artikel | Firma |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------|
| Autoklav | Webeco | Mikrowelle | Siemens |
| Blotkammer | Hartenstein | Netzgerät | Hartenstein |
| Bunsenbrenner | Hartenstein | PCR-Gerät | Progene |
| Concentrator 5301 | Eppendorf | pH-Meter | Hartenstein |
| Drigalski-Spatel | Hartenstein | Pipettierboy | Brand |
| Durchflusszytometer XL | Beckman Coulter | Röntgenfilmentwickler | Fa. Kodak |
| Eismaschine | Hartenstein | Rollordrum™ | New Brunswick Scientific Co. |
| Elektroporationsgerät | BIO-RAD | Schüttelinkubator | Hartenstein |
| ELISA-Reader | Molecular Devices | Schüttler | Hartenstein |
| Eppendorfständer | Sarstedt | Sequencer | BeckmanCoulter |
| Erlenmeyerkolben | Schott | Stereomikroskop | Leica |
| Fast Prep FP120 | Bio101 ThermoSavt | Sterilbänke | Lamina Air, Heraeus |
| Feinwaage | Sartarius | Stickstofftanks | K-Series |
| Filterschrank | Hartenstein | Sterilbänke | Lamina Air, Heraeus |
| Fluoreszenzmikroskop | Leica | Thermostat | Hartenstein |
| Fuchs-Rosenthalkammer | Loptik Labor | Tiefkühltruhe | Privileg Deluxe |
| Gene Pulser | BioRad | Tischzentrifuge | Hartenstein |
| Gewebekulturschrank | Heraeus | Uhr | Hartenstein |
| Grobwaage | Sartarius | Ultraschallgerät | Heinemann |
| Impföse | Hartenstein | UV-Leuchtschirm | Vilber Coumat |
| Inverses Mikroskop | Leitz Labovert | Vibrax | Hartenstein |
| JA-Rotor | Beckmann | Videoprinter | Misubishi |
| Kamera | VisitronPuchheim | Vortexer | Heidolph, Boskamp |
| Kameras | Princeton Instruments | Wasserbad | Hartenstein |
| Klettphotometer | Summerson | Zentrifugenröhrchen | Greiner |
| Kühlschrank | Privileg Deluxe | Zentrifuge | Heraeus |
| Magnetrührer | Hartenstein | | |

3.7 Verbrauchsmaterialien

| Artikel | Firma | Artikel | Firma |
|----------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| Alufolie | Alio | Greinerröhrchen 50 ml | Greiner |
| Blotpapier, 3mm, 190g/m | Schleicher, Schuell | Nylonmembran | Hybond |
| Einwegimpfösen | Sarstedt | Parafilm | Hartenstein |
| Eppendorfcaps 1.5 ml | Sarstedt | Petrieschalen | Sarstedt |
| Eppendorfcaps 2.0 ml | Sarstedt | Röntgenfilm13×18cm | x-ray Retina |
| Frischhaltefolie | Alio | serolog. Pipetten | Sarstedt |
| Gewebekulturflaschen | Greiner | Spitzen | Sarstedt |
| Gewebekulturschalen | Greiner | Sterilfilter | Schleicher, Schuell |
| Glaskugeln | Serva | Tücher | sk Laborbedarf |
| Greinerröhrchen 15 ml | Greiner | Whatmann Rundfilter | Schleicher, Schuell |
| Handschuhe | Roth | Zahnstocher | Aldi |

3.8 Chemikalien

Die benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer, Difco, Gibco-BRL, Merck, Oxoid, Roth, Serva und Sigma bezogen.

3.8.1 Spezielle Chemikalien für zellbiologische Versuche

| Name | Stammlösung | Endkonzentration | Hersteller |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------|------------|
| 7-Aminoactino- mycin-D (7-AAD) | 1 mg/ml in DMSO | 2 µg/ml | Sigma |
| Trypanblaulösung | 10 % in PBS | 0.02 % | Sigma |
| GM-CSF | 200 U/µl in H ₂ O | 200 U/ml | Stratagene |
| mIL-2 | 5,0*10 ⁵ U/ml | 30 U | Stratagene |
| ConA | 5 µg/m | 2.5 µg/ml | Sigma |
| Lactacystin | 5×10 ⁶ U/ml | 10 µM | Sigma |

3.9 Enzyme

Die verwendeten Enzyme stammen von den Firmen Amersham, Appligene, Biozym, Boehringer, Eppendorf, Genaxxon, Gibco-BRL, MBI-Fermentas, New England Biolabs, Pharmacia, Promega, Qbiogene, Roche und Stratagene.

3.10 Molekulargewichtsstandard

Molekulargewichtsmarker für DNA

Gene Ruler™ 1 kb-DNA-Ladder
(Fermentas)

| Bande | kb |
|-------|------|
| 1 | 10 |
| 2 | 8 |
| 3 | 6 |
| 4 | 5 |
| 5 | 4 |
| 6 | 3,5 |
| 7 | 3 |
| 8 | 2,5 |
| 9 | 2 |
| 10 | 1.5 |
| 11 | 1 |
| 12 | 0.75 |
| 13 | 0.5 |
| 14 | 0.25 |

Molekulargewichtsmarker für Proteine

Prestained Precision Plus Protein™
Standards (BioRad)

| Bande | kb |
|-------|-----|
| 1 | 250 |
| 2 | 150 |
| 3 | 100 |
| 4 | 75 |
| 5 | 50 |
| 6 | 37 |
| 7 | 25 |
| 8 | 20 |
| 9 | 15 |
| 10 | 10 |

3.11 Proteine und Peptide

Hühner-Ovalbumin wurde von der Fa. Sigma bezogen.

Das Peptid OVA257-264 (SIINFEKL) wurde freundlicherweise von Peter Henklein aus der Charite-Universitätsmedizin Berlin synthetisiert.

3.12 Antikörper

In den nachfolgenden Tabellen sind alle Antikörper aufgelistet, die in dieser Arbeit für die Durchflußcytometrie (DZ) und für den ELISPOT (ES) verwendet wurden.

| Spezifität | Anti- | Klon | Verwendung | Konjugat | Firma |
|---|-------|---------|------------|--------------|---------------|
| CD4 (L3T4) | Maus | GK1.5 | DZ | FITC | BD Pharmingen |
| | | RM4-5 | | Cy-chrome™ | |
| CD8a (Ly-2) | Maus | 5.3-6.7 | DZ | FITC | BD Pharmingen |
| | | 5.3-6.7 | DZ | Cy-chrome™ | BD Pharmingen |
| CD44 (Pgp-1, Ly-24) | Maus | IM7 | DZ | PE-Cy5 | BD Pharmingen |
| CD16/CD32 (Fc γ III/II)Rezeptor | Maus | 2.4G2 | DZ | aufgereinigt | BD Pharmingen |
| DO11.10 TCR | Maus | KJ1-26 | DZ | FITC | BD Pharmingen |
| IFN- γ | Maus | XMG1.2 | ES | biotinyliert | BD Pharmingen |
| | | R4-6A2 | ES | aufgereinigt | |
| | | XMG1.2 | DZ | PE | |
| IgG $_{1,k}$ | Ratte | R3-34 | DZ | PE | BD Pharmingen |
| IgG $_{2a,\lambda}$ (anti-KLH) | Ratte | B39-4 | DZ | FITC | BD Pharmingen |
| | | | | Cy-chrome | |
| V α 2 TCR | Maus | B20.1 | DZ | FITC | BD Pharmingen |
| V β 5.1, 5.2 TCR | Maus | MR 9-4 | DZ | PE | BD Pharmingen |

Die Streptavidin-Alkaline Phosphatase wurde von der Fa. BD Pharmingen bezogen. Das Tetramer H-2K⁹/PE SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) (TO3000) wurde von der Fa. Beckman Coulter zur Verfügung gestellt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten primären und sekundären Antikörper für Western Blots, Immunofluoreszenzanalysen und ELISAs aufgelistet

| Spezifität | Kopplung | Spezies | Hersteller |
|-------------------------|---------------------|-----------|------------|
| α -Lm ActA (pk) | affinitätsgereinigt | Kaninchen | M. Kuhn |
| α -Lm InlA (pk) | affinitätsgereinigt | Kaninchen | Seqlab |
| α -Lm InlB (pk) | affinitätsgereinigt | Kaninchen | Seqlab |
| α -mZMV IE1 (mk) | affinitätsgereinigt | Maus | W. Brune |
| α - Ova (pk) | affinitätsgereinigt | Kaninchen | Sigma |
| α -Kaninchen IgG | FITC | Ziege | Sigma |
| α -Maus IgG | FITC | Ziege | Sigma |
| α -Maus IgG | Peroxidase | Ziege | Dianova |
| α -Kaninchen IgG | Peroxidase | Ziege | Dianova |
| α -Phalloidin | TRITC | | Sigma |

3.13 Zellkultur-Medien

Soweit nicht anders angegeben stammen alle Zellkulturmedien von Gibco

- RPMI 1640 mit L-Glutamin
- Minimal Essential Medium
- Trypsin/EDTA-Lösung
- L-Glutamin, 200 mM (100x)
- MEM non-essential amino acids, 100x
- MEM Natriumpyruvat, 100 mM
- Natriumbicarbonat 7,5 %
- Dulbecco´s Mod Eagle Medium (DMEM) with High Glucose
- Dulbecco´s PBS
- Ampuwa-H₂O

Fa. Biochrom KG: • Fötales Kälberserum (FKS)

3.14 Kits

- GFXTM Micro Plasmid Prep Kit, Amersham
- E.Z.NA Total RNA Kit , Peqlab
- QIAquick[®] PCR Purification Kit, QIAgen
- Nucleobond[®] AX Purification of Plasmids, Macherey-Nagel
- RNeasy[®] Mini Kit, QIAgen
- DNA-freeTM Kit, Ambion
- ECLTM Western blotting detection reagents, Amersham Pharmacia
- Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit, Beckman Coulter
- Mouse T Lymphocyte Enrichment Set-DM, BD Biosciences
- DNAzol[®] Reagent, Invitrogen
- BD OptEIATM Mouse IFN- γ Set, BD Biosciences
- Revert AcidTM Reverse Transkriptase Kit, Fermentas
- SuperScriptTM II Reverse Transcriptase, invitrogen
- Lipofectamine PlusTM Reagent, Life Technologies
- Bradford Assay, BioRad
- BD OptEIATM TMB Substrate Reagent Set, BD Biosciences
- BCIP/NBT Blue Liquid Substrate for membranes, Sigma

3.15 Verwendete Software

| Programm | Verwendung | Hersteller |
|-----------------------------------|--|-------------------|
| Excel 2003 | Tabellenkalkulation und Statistik | Microsoft |
| SystemII | Datenaufnahme mit Durchflußzytometer | Beckman Coulter |
| Metamorph Imaging Software | Bildaufnahme mit Fluoreszenzmikroskop | Universal Imaging |
| VectorNTI 6.0 | Plasmidkonstruktion, Sequenzanalysen | Inforomax |
| Photoshop 7.0 | Bildverarbeitung | Adobe |
| CorelDraw 12 Corel Photo Paint | Bildverarbeitung, Diagrammverarbeitung | Corel |
| WinMDI 2.8 | Durchflußzytometrie Datenverarbeitung | J. Trotter |

4.1 Molekulargenetische Methoden

4.1.1 Übersicht über die Herstellung rekombinanter Vektoren

Die Klonierung eines Gens oder Genfragmentes, dessen Sequenz bekannt ist beinhaltet verschiedene methodische Schritte. Zuerst werden zwei spezifische Oligonukleotide erstellt, abgeleitet aus der Sequenz des zu klonierenden Gens. Man modifiziert diese meist so, dass der amplifizierte DNA-Abschnitt um Restriktionsschnittstellen ergänzt wird. Anschließend isoliert man die Matrize (template), die das zu klonierende Gen oder Genfragment enthält (→ 4.1.1.1, 4.1.1.2, 4.1.1.3). Die Vervielfältigung des DNA-Abschnittes wird in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (→ 4.1.1.4) bewerkstelligt. Nach anschließender Aufreinigung (→ 4.1.1.9) wird das DNA-Fragment mit Restriktionsenzymen verdaut (→ 4.1.1.10) und direkt in eine Expressionskassette auf einem durch dasselbe Restriktionsenzym linearisierten dephosphorylierten Plasmidvektor ligiert (→ 4.1.1.11, 4.1.1.12). Anschließend erfolgt die Transformation (→ 4.1.1.13) der nun rekombinanten DNA in kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen, die Selektion der transformierten Bakterien, die Aufreinigung der rekombinanten Plasmid-DNA aus den positiven *E. coli*s (→ 4.1.1.13) und zuletzt die Überprüfung der Klonierung (→ 4.1.1.14).

4.1.1.1 Isolation von genomischer DNA aus Bakterien

Vor der eigentlichen Isolation der genomischen DNA erfolgt ein Lysisschritt der *Listeria spp.* Dazu wird das Bakterienpellet in 10 mM Tris-HCL, pH 8.0 mit 2 mg/ml Endkonzentration an Lysozym-Lösung (Stockkonzentration: 120 mg/ml in H₂O) resuspendiert und bei 37 °C inkubiert bis ein weißes Präzipitat ausfällt (ca. 10 min). Nach Abzentrifugation und Verwerfen des Überstandes wird die DNA isoliert. Die Isolation von genomischer DNA aus *Listeria spp.* erfolgt durch das Reagenz DNAzol® (Invitrogen) das eine schnelle Aufreinigung ermöglicht. Das Prinzip basiert auf einem Guanidin-Lysis-Puffer, welcher RNA hydrolysiert und die selektive Präzipitation der DNA aus dem *Listeria*-Zelllysat durch Zugabe von ½ Volumen 100 % Ethanol ermöglicht. Nach einem Waschschrift mit 75 % Ethanol löst man anschließend die DNA in 8 mM NaOH.

4.1.1.2 Herstellung von Schnelllysat aus *E. coli* oder *Lm*

Zur schnellen Isolierung von chromosomaler oder auch extrachromosomaler DNA kann die Herstellung eines Schnelllysats dienen. *E. coli*-oder *Lm*-Kolonien werden in 50 µl H₂O resuspendiert und für einige Minuten (*E. coli* 7 min, *Lm* 12 min) bei 110 °C aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wird

das Lysat kurz bei 14000 rpm abzentrifugiert und anschließend wird es als Template in einer PCR Reaktion eingesetzt.

4.1.1.3 Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Diese Methode dient der Gewinnung von Plasmid-DNA, die für Klonierungsarbeiten oder zur Sequenzierung verwendet wird. Die Isolierung des Plasmids wird mit Hilfe des GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham) oder für größere Mengen an Plasmid-DNA mit dem Kit Nucleobond® AX Purification of Plasmids (Macherey-Nagel) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Plasmid-DNA wird in 50 µl Aqua Millipore (MQ-H₂O) aufgenommen.

4.1.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion („PCR=polymerase chain reaction“) ermöglicht die gezielte Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. DNA-Doppelstränge werden beim Erhitzen denaturiert und mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase in der Gegenwart komplementärer 20-23 Basen lange Olikonukleotide, sog. Primer, amplifiziert. Für jeden Strang der Doppelhelix werden dabei solche Primer benötigt, welche die Zielsequenz einrahmen und damit sequenzspezifisch sind. Die Primer enthalten zusätzliche Schnittstellen (Restriktionsschnittstellen), um z.B. ein DNA-Fragment in einen Vektor umklonieren zu können. Wird dieser Prozess mehrfach wiederholt, erfolgt eine exponentielle Zunahme der DNA-Fragmente, mit der durch die beiden Primer festgelegten Größe. Die einzelnen Schritte der PCR sind dabei folgende: im ersten Reaktionszyklus wird die vorliegende doppelsträngige DNA, die als Matrize („template“) für die Synthese dient, bei 94 °C in Einzelstränge denaturiert; anschließend werden die beiden Primer an die ssDNA bei 40-60 °C anhybridisiert (Annealing) und in einer durch DNA-Polymerase katalysierten Reaktion werden in Gegenwart von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) die Einzelstränge zu einem Doppelstrang bei 72 °C aufgefüllt (Elongation). Zu Beginn der PCR-Zyklen wird ein anfänglicher Schmelzschritt zur vollständigen Denaturierung der Matrizen-DNA vorausgeschickt, wohingegen am Ende der PCR ein 5-minütiger Syntheseschritt zum Beenden der Elongationen angehängt wird. Die am häufigsten verwendete Polymerase ist die Taq-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Wegen der Hitzestabilität dieses Enzyms kann in einem geschlossenen System in sich wiederholenden Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation gearbeitet werden. Der PCR-Reaktionsansatz mit Taq-DNA Polymerase wird folgendermaßen für einen 50 µl-Ansatz errechnet:

- 5 µl 10×Puffer
- 3 µl MgCl₂ (25 mM) Endkonzentration: 1.5 mM
- 1 µl dNTP Mix (20 mM) Endkonzentration: 400 µM
- je 1 µl Olikonukleotide (1 µg/µl)
- 0.5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
- 5 µl Matrize (50 ng genomische DNA oder 5 ng Plasmid-DNA), ad 50 µl MQ-H₂O

Zur fehlerfreien Amplifikation eines Gens oder DNA-Fragmentes wird hauptsächlich die Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, aufgrund ihrer zusätzlichen „Proofreading-Funktion“ (3'→5'

Exonukleaseaktivität) verwendet. Allerdings besitzt diese DNA Polymerase eine langsamere Extensionsrate, sie amplifiziert ca. 1 kb in 2 Minuten. Der Reaktionsansatz wird für einen 100 µl Ansatz folgendermaßen zusammenpipetiert:

- 10 µl 10×Puffer
- je 1 µl Olikonukleotide (1 µg/µl)
- 1 µl Proof-reading-Polymerase (2 U/µl)
- 1 µl dNTP Mix (20 mM) Endkonzentration 200 µM
- 1 µl Matrize (50-100 ng genomische DNA oder 5-10 ng Plasmid-DNA)
- 0-8 µl MgSO₄ (100 mM) Endkonzentrationen: 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM
ad 100 µl MQ-H₂O

Gewählte PCR-Zeiten und Temperaturen:

- Initialer Schritt: 3 min 94 °C 1 Zyklus
 - Denaturierung: 1 min 94 °C
 - Primeranlagerung: 1 min 48-64 °C
 - Primerverlängerung: 1 min* bzw. 2 min** pro 1kb 72°C
- } 30 Zyklen
- letzter Schritt: 5 min 72 °C 1 Zyklus

*: Taq-DNA Polymerase, **: Pfu-DNA Polymerase

4.1.1.5 Touchdown-PCR

Falls nun Oligonukleotide gewählt werden müssen, deren Schmelztemperaturen sich stark unterscheiden, kann die Methode der Touchdown-PCR angewendet werden. Sowohl die Spezifität als auch die Ausbeute der PCR-Produkte kann durch diese Methode erhöht werden.

Es handelt sich dabei um eine Standard-PCR, bei der die Annealing-Temperatur schrittweise pro Zyklus gesenkt wird. Die PCR startet meist 2-3 °C über der ermittelten Annealing-Temperatur und wird dann in den ersten 10-15 Zyklen pro Zyklus um 0.5 °C abgesenkt. Dadurch wird das Annealing bei höheren Temperaturen begünstigt, was zu einer größeren Spezifität der PCR-Produkte führt. Anschließend werden 10-15 Zyklen der ursprünglich ermittelten Annealing-Temperatur durchgeführt.

4.1.1.6 Rekombinante PCR

Die rekombinante PCR Technik (Abb.: 4.1) kann zur Verknüpfung zweier Sequenzen ohne die Einführung einer Restriktionsschnittstelle genutzt werden. Für diese Reaktion werden vier Olikonukleotide verwendet, wobei sich zwei in 16 Basenpaaren überlappen müssen. Der erste Reaktionsschritt ist die getrennte Amplifikation zweier DNA-Fragmente mit den Primern A und B sowie C und D, wobei eine „Proofreading-Polymerase“ verwendet wird. Anschließend werden die zwei erhaltenen Fragmente aufgereinigt, gemischt und in einer zweiten PCR-Reaktion miteinander

ohne Zusatz von Oligonukleotiden bei einer niedrigen Temperatur von 45 °C hybridisiert. Es sollte dabei in 8 wiederholenden Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation gearbeitet werden. Schließlich wird eine Vervielfältigung des gezielten DNA-Fragmentes dadurch erreicht, dass in einer dritten PCR-Reaktion die äußeren Primer A und D und die „Proofreading-Polymerase“ zu den erhaltenen PCR-Produkten aus der zweiten PCR, dazugegeben werden. Die fertigen DNA-Fragmente werden gelelektrophoretisch getrennt, ausgeschnitten und aus dem Gelstück eluiert (→ 4.1.1.8, 4.1.1.9).

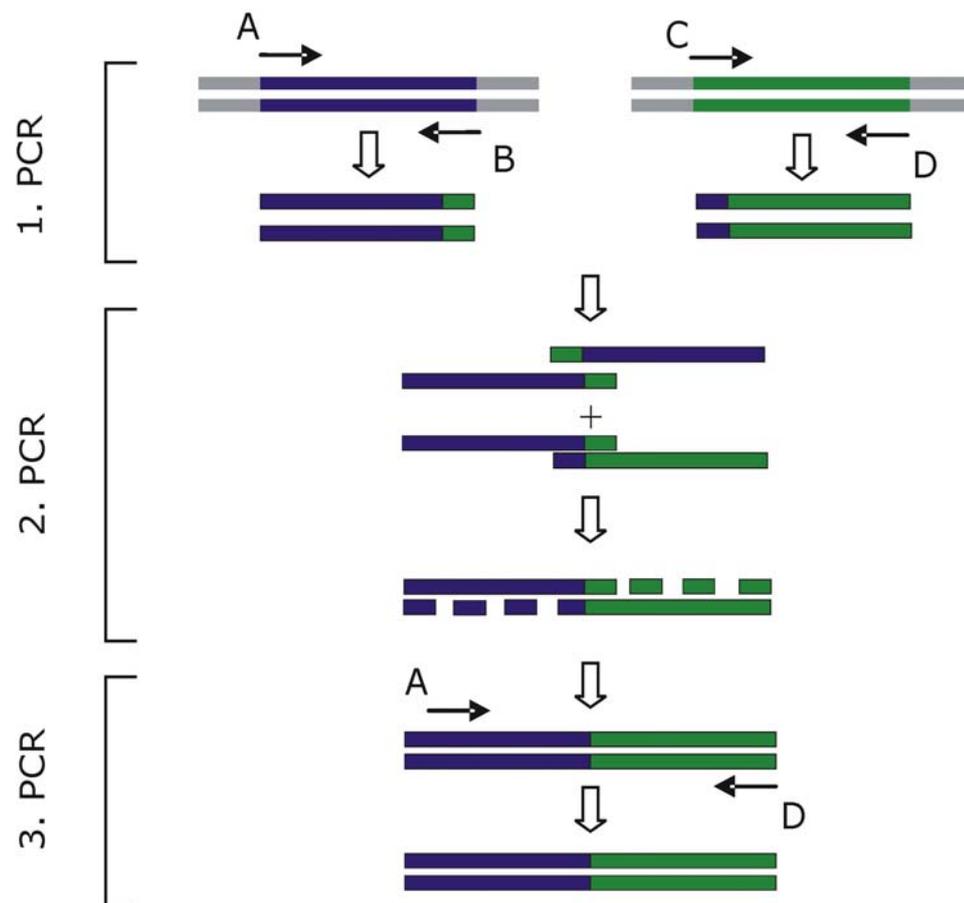


Abb. 4.1: Schema einer rekombinanten PCR mit drei einzelnen PCR-Reaktionen. A-D repräsentieren Oligonukleotide, wobei B und C komplementär zueinander sind.

4.1.1.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm. Dafür sind die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Um die Reinheit (=Proteinfreiheit) der Probe bestimmen zu können wird zusätzlich bei 280 nm gemessen. Der Quotient aus 260 nm / 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit; er sollte zwischen 1.5-2.0 liegen. Liegt er bei 1.8, so liegt eine reine DNA-Lösung vor, liegt er dagegen bei 2.0, so handelt es sich um eine reine RNA-Lösung. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner.

Messung der Proben:

- die Probe wird 1:100 in H₂O verdünnt, in eine Quarzküvette gefüllt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen
- die Konzentration der DNA [$\mu\text{g/ml}$] wird folgendermaßen berechnet:
$$\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ (dsDNA)}$$
$$\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 30 \text{ (ssDNA)}$$
- die Konzentration von RNA wird dagegen folgendermaßen berechnet:
$$\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

4.1.1.8 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die horizontale Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung linearisierter Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Moleküle nach ihrer Größe. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern in der Elektrophorese zur Anode. Dies geschieht umso langsamer, je größer sie sind. Ringoffene („open circular“) wandern deshalb langsamer als lineare Formen und die verdrillte Ringform („covalently closed circular“) von Plasmiden wandert als kompakteste Form am schnellsten. Das dem Agarosegel zugesetzte Ethidiumbromid kann sich aufgrund seiner interkalierenden Eigenschaft zwischen einzelnen Basenpaaren eines doppelsträngigen DNA-Moleküls einlagern und ermöglicht somit das Fluoreszieren der DNA-Moleküle bei Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm oder 300 nm). Es können je nach Agarosegelkonzentrationen 0.2-20 kb große DNA-Fragmente aufgetrennt werden. Ein 1 %-iges Gel ermöglicht die Auftrennung von 0.4 bis 6 kb großen DNA-Fragmenten. Die DNA-Probe wird mit 1/5 Vol. Probenpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wird ein standardisierter DNA-Längenmarker aufgetragen, mit dessen Hilfe die Fragmentgrößen der aufgetrennten DNA abgeschätzt werden. Das Gel läuft bei einer konstanten Spannung von 150 V für 30-40 min und wird anschließend unter UV-Licht fotografiert.

Puffer für Agarosegel-Elektrophorese:

- 10× TBE-Puffer
109 g Tris
62.5 g Borsäure
9.3 g EDTA
ad 1000 ml H₂O_{dest.}
- Ethidiumbromidlösung
10 mg/ml in H₂O_{dest.}
- 5× Probenpuffer
40 % (w/v) Saccharose
30 % (v/v) Glycerin
50 mM EDTA
jeweils 0,001 % (w/v) Xylencyanol und Bromphenolblau, ad 10 ml H₂O_{dest.}

4.1.1.9 Reinigung von DNA aus PCR Ansätzen oder Präparation von DNA aus Agarose-Gelen

Sofern die PCR ein Fragment der richtigen Größe amplifiziert hat (siehe Agarose-Gel-Elektrophorese, 4.1.1.8), wird der restliche Ansatz mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen) gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Treten neben der gewünschten Bande auch Nebenbanden auf, wird dieser PCR-Ansatz der Größe nach im Agarosegel aufgetrennt und dann aus dem Gel, dem Herstellerprotokoll des oben genannten Kits entsprechend, eluiert. Anschließend wird die DNA in 50 µl MQ-H₂O aufgenommen. Dieser Kit kann auch zur Aufreinigung von Verdauansätzen und für Sequenzieransätze (PCR-Produkt) verwendet werden.

4.1.1.10 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonucleasen sind Endodesoxyribonucleasen, die spezifisch Sequenzen auf der doppelsträngigen DNA erkennen und an beiden Strängen der DNA spalten. Die für gentechnologische Experimente wichtigsten Enzyme sind die Typ II-Endonucleasen. Diese können doppelsträngige (ds) DNA sequenzspezifisch schneiden. Dabei können die Restriktionsendonucleasen den Doppelstrang in glatte Enden („blunt ends“) oder in überhängende Einzelsträngenden („sticky ends“) schneiden.

Als theoretisch einzusetzende Enzymmenge definiert man: 1 U Enzym spaltet 1 µg DNA in 1 h bei einer für das Enzym optimalen Temperatur (Normalfall 37 °C). Ein Spaltansatz enthält neben der zu verdauenden DNA noch so viel H₂O_{dest.} und 10× Puffer, damit die Endkonzentration des Puffers im Ansatz optimal für das verwendete Enzym ist. Manchmal können auch zwei Enzyme gleichzeitig verwendet werden, wenn beide die gleiche Pufferkonzentration und Spalttemperatur benötigen. Folgende Reaktionsansätze werden standardmäßig verwendet:

- 1-2 µg Plasmid-DNA/PCR-Fragment
- 10× Puffer (enzymspezifisch)
- 0.5-2 µl Restriktionsenzym, ad 20-30 µl MQ-H₂O

Die Inkubation erfolgt für 2 h bei 37 °C. Anschließend wird die Vollständigkeit des Verdau durch elektroforetische Auftrennung auf einem Agarosegel kontrolliert (→ 4.1.1.8).

Im Gegensatz zum oben beschriebenen vollständigen Verdau, bei dem die DNA komplett verdaut wird, wird beim partiellen Verdau mit einer geringen Enzymmenge gearbeitet. Dadurch bleiben einige Schnittstellen intakt. Der partielle Verdau ist nötig, wenn man z.B. im Rahmen einer Klonierung auf eine Schnittstelle angewiesen ist, die mehrmals vorkommt. Um einen singulären Schnitt zu erhalten wird partiell verdaut. Folgende Reaktionsansätze werden verwendet:

- 1-2 µg Plasmid-DNA/ PCR-Fragment
- 10× Puffer (enzymspezifisch)
- 1 µl einer 1:10 Verdünnung des notwendigen Restriktionsenzym, ad 50 µl MQ-H₂O

Die Inkubation erfolgt für 1 h bei 37 °C. In dieser Inkubationszeit werden alle 5 min 5 µl des Reaktionsansatzes herausgenommen und in einem extra Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wird der partielle Verdau durch elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel (→ 4.1.1.8) kontrolliert und die gewünschte Bande wird herausgeschnitten und aufgereinigt (→ 4.1.1.9).

4.1.1. 11 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Für die Dephosphorylierung von Plasmid-DNA wird die alkalische Phosphatase CIAP (calf intestine alkaline phosphatase) verwendet. Dieses relativ unspezifisch arbeitende Enzym spaltet im alkalischen Milieu (pH 9.5-10.5) die 5'-Phosphatgruppen von DNA, RNA sowie Ribo- und Desoxy-Ribonukleosiden ab. Diese Dephosphorylierung von DNA-Molekülen verhindert die durch DNA-Ligase katalysierte Zirkularisierung linearer, doppelsträngiger DNA-Moleküle, da dieses Enzym den endständigen 5'-Phosphatrest benötigt. Die Unterdrückung dieser Reaktion dient dazu, den Einbau der Fremd-DNA in einen linearisierten Klonierungsvektor zu begünstigen und dadurch die Klonierungseffizienz zu erhöhen. Zur Dephosphorylierung wird dem gesamten Vektorverdau 1/10 des Endvolumens an 10x CIAP-Puffer und 1 µl (1 Unit) Enzym hinzugefügt. Die Inkubation erfolgt für 30-60 min bei 37 °C. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase kann durch eine 15-minütige Inaktivierung bei 65 °C oder durch Aufreinigung mittels des Quiagenkits (→ 4.1.1.9) gestoppt werden.

4.1.1 12 Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor

Nachdem Klonierungsvektor und DNA-Fragment, welche die gewünschte genetische Information tragen, mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten und auf ihre Richtigkeit durch Gelelektrophorese (→ 4.1.1.8) kontrolliert wurden, werden sie ligiert:

Durch das Mischen der Partner bilden sich über die gleichen Einzelstrangenden der DNA-Moleküle nichtkovalente geschlossene Ringe aus, die über Wasserstoffbrücken der komplementären Basen zusammengehalten werden. Nach Zugabe von T4-DNA-Ligase werden unter ATP-Verbrauch an den vier Bruchstellen die Phosphorsäuremonoester in Diester überführt und damit ein kovalent geschlossener DNA-Doppelstrang gebildet. Die T4-DNA-Ligase kann sowohl kohäsive Enden („sticky ends“) als auch glatte („blunt ends“) Enden miteinander ligieren. Rekombinante Plasmide mit neuem Erbmaterial entstehen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzymen entstehen immer kohäsive Enden. Folgender Ligationsansatz wird standesmäßig verwendet:

- 3- bis 4-facher molarer Überschuß an geschnittenem Fragment im Vergleich zum dephosphorylierten, geschnittenen Vektor (Größe der DNA-Fragmente und Konzentrationen werden berücksichtigt)
- 10x T4-Ligase-Puffer (enthält ATP)
- 1,0 µl T4-Ligase (1U/µl)
ad 20 µl MQ-H₂O

Der Ligationsansatz wird 3 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 15 °C inkubiert und dann wird ein Teil davon für eine Transformation in *E. coli* (→ 4.1.1.13) eingesetzt. Neben den normalen

Ligationsansätzen sollte man als Ligationskontrolle einen Ansatz mit inkubieren, der anstelle des Fragmentes MQ-H₂O enthält.

4.1.1.13 Transformation von *E. coli*-Zellen

Als Transformation wird die genetische Veränderung einer Rezipientenzelle durch direkte Aufnahme von freier DNA aus dem Lebensraum bezeichnet. Eine Bakterienzelle kann nur dann DNA aufnehmen, wenn sie sich im physiologischen Zustand der Kompetenz befindet, die induzierbar ist. Bei grampositiven Bakterien (*Streptococcus*, *Bacillus*) ist der Zustand der Kompetenz Teil ihres natürlichen Lebenszyklus. Dagegen werden viele gramnegative Bakterien erst in den Zustand der Aufnahme versetzt, wenn ihre Zellwand mit Hilfe chemischer Methoden (mit CaCl₂) oder mit Stromstößen (Elektroporation) für die DNA durchlässig gemacht wird.

4.1.1.13.1 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Jeder Transformationsreaktion geht die Herstellung elektrokompetenter Zellen voraus, die bei -80 °C bis zu ihrem Gebrauch ohne Effizienzverlust gelagert werden können:

- 50 ml 2 YT-Medium wird mit einer Übernachtskultur von *E. coli* DH10b oder *E. coli* DH5α 1:50 angeimpft
- anschließend lässt man die Bakterien zu einer logarithmischen Phase von 0.5-0.8 OD₆₀₀ wachsen, dann für 15-30 min auf Eis abkühlen und bei 4800 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugieren
- danach wird das Bakterienpellet dreimal mit 1/1, 1/2, 1/10 Vol. an eiskaltem Wasser/Glycerol (10 %)-Gemisch gewaschen
- schließlich wird das Pellet in 500 µl Wasser/Glycerol (10 %)-Gemisch resuspendiert, zu 100 µl Aliquots portioniert und bei -80°C eingefroren

Medien für die Herstellung von elektrokompetenten Zellen:

- 2 YT-Medium:
 - 16 g Bacto-Pepton
 - 10 g Yeast Extract
 - 10 g NaCl
 - ad 1000 ml H₂O_{dest.}
- Wasser/Glycerol (10%)-Gemisch

4.1.1.13.2 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation

Die Elektroporation ist eine Methode, bei der die Zellwand der kompetenten Bakterien mittels eines starken Strompulses (2,5 kV, 25 µF, 200 Ωhm, ca 4-6 sec) kurzzeitig durchlässig für die Aufnahme von Plasmid-DNA wird. Die Effizienz liegt dabei etwa bei 10⁷ bis 10¹⁰ Kolonien pro µg DNA.

Anschließend werden die transformierten Bakterien mittels eines auf dem verwendeten Klonierungsvektor vorhandenen Resistenzgens selektiert. Ein Elektroporationsansatz sieht folgendermaßen aus:

- 2-6 μ l Ligationsansatz werden mit 100 μ l kompetenten *E. coli* Zellen in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette auf Eis gemischt
- danach erfolgt die Elektroporation bei 2.5 kV, 25 μ F, 200 Ω hm, ca 4-6 sec.
- anschließend wird sofort 1 ml 2YT-Medium zugegeben und der ganze Ansatz wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt
- je nach Antibiotikum erfolgt die Zwischenzüchtung bei 37 °C für unterschiedliche Inkubationsstunden (z. B für Erythromycin: 3h)
- schließlich werden die Zellen auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und für 1-2 Tage bei 37 °C inkubiert.

4.1.1.14 Sequenzierung von DNA

Unter Sequenzierung versteht man die Bestimmung der Baseabfolge in einem DNA-Molekül. Es werden heute meist zwei methodisch unterschiedliche Verfahren angewendet: die Maxam-Gilbert-Technik und das Sanger-Verfahren. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Sequenzierung nach Sanger durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip des kontrollierten Kettenabbruchs beim Einbau von Didesoxyribonucleosidtriphosphaten (ddNTPs). Nach Denaturierung des zu sequenzierenden doppelsträngigen Templates durch Hitze werden Primer-Oligonukleotide an die jetzt einzelsträngige DNA hybridisiert. Die DNA-Polymerase kann nun den Gegenstrang synthetisieren. Durch mehrere im Reaktionsgemisch enthaltene fluoreszenz-markierte Nucleosidtriphosphate wird die neu synthetisierte DNA markiert. In vier getrennten Terminationsansätzen mit den jeweiligen ddNTPs kommt es matrizenabhängig zum statistischen Einbau der ddNTPs an Stelle von dNTPs, was schließlich zum Kettenabbruch führt. Bei dem Cycle-Sequenzieren werden die notwendigen Kopien durch mehrmaliges Wiederholen der Zyklen Denaturierung, Annealing und Elongation erzeugt. Das isolierte DNA-Molekül wird mit dem „Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start“ von Beckman Coulter nach Herstellerprotokoll aufgearbeitet (Kopieerzeugung). Anschließend wird mit 100%-igen Ethanol gefällt, für den Sequenzer vorbereitet, verarbeitet und schließlich mit Hilfe eines Sequenzchromatogrammes ausgewertet.

4.1.2 Arbeiten mit RNA

4.1.2.1 RNA-Isolierung aus *Lm* spp.

Wird mit RNA gearbeitet, sollte man um Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden auf jedenfall Handschuhe tragen und RNase freie Materialien verwenden.

Für die Isolation von RNA aus *Listerien* werden diese wie in 4.2.6 beschrieben zu einer optischen Dichte von 1.0 bei 600 nm kultiviert und anschließend 10 ml der Kultur abzentrifugiert. Das Pellet kann bis zur Weiterverarbeitung in -80°C gelagert werden. Die RNA aus *Listerien* wird nach der Anleitung des RNeasy Mini Kits isoliert (Quiagen). Zusätzlich wird vor der RNA-Elution eine DNase

Behandlung nach Quiagen-Protokoll durchgeführt. Schließlich wird die Konzentration der erhaltenen RNA (→ 4.1.1.7) bestimmt und bei -80°C aufbewahrt.

4.1.2.2 DNase Behandlung von RNA

Die DNase Behandlung der RNA mit dem DNA-free Kit von Ambion erfolgt genau nach Anleitung des Herstellers. Nach der DNase Behandlung sollte zur Kontrolle auf nicht Vorhandensein von DNA eine PCR-Reaktion mit der RNA durchgeführt werden. Wird kein PCR-Produkt erhalten, kann davon ausgegangen werden, dass die RNA DNA frei ist.

4.1.2.3 Slot-Blot

Fünf Mikrogramm der isolierten Gesamt-RNA aus *Lm spp.* wird in einem Volumen von 10 µl frischer RNA-Denaturierungspuffer aufgenommen, für 5 min bei 65 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Danach wird die Probe mit 40 µl 20× SSC versetzt und in die Slots einer unter Vakuum stehenden Bio Dot®-Vakuumkammer auf eine Hybond™-N⁺ Nylonmembran transferiert, die zuvor bereits über 60 min in 20× SSC vorinkubiert wurde. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml 10× SSC pro Slots und anschließendem 5-minütigem Trocknen der Membran wurden die Nukleinsäuren mittels UV-Licht auf die Membran fixiert.

Nach der Fixierung wird die Membran mit dem vorher auf 42 °C erwärmten Hybridisierungspuffer (aus „AlkPhos Direct Labelling Kit“ von Amershan Biosciences) versetzt und für 15-60 min bei 42 °C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Parallel dazu wird eine PCR-Sonde, welche die gewünschte mRNA detektieren soll, hergestellt. Dafür wird 200 ng in 20 µl DEPC-Wasser des aufgereinigten PCR-Fragmentes mit einer thermostabilen alkalischen Phosphatase des Labelling Reagent nach Herstellerprotokoll gekoppelt und nach beendeter Prähybridisierung dem Ansatz zugegeben. Es folgte die weitere Hybridisierung bei 42 °C über Nacht im Schüttelwasserbad.

Am nächsten Tag wird die Membran zweimal für jeweils 20 min im vorgewärmten Primärwaschpuffer bei 42 °C im Schüttelbad gewaschen. Anschließend erfolgten zwei weitere Wachsschritte bei Raumtemperatur in 2× SSC. Abschließend wird die Membran mit der Detektionsreagenz aus dem ECL-Kit von Amershan für 1 min inkubiert, in eine neue Frischhaltefolie ohne Luftblasen eingewickelt und in eine Expositionskassette plaziert. Die leuchtenden Banden können durch Auflegen eines Röntgenfilms dokumentiert werden. Die Expositionszeit variiert dabei je nach Stärke des Signals zwischen wenigen Sekunden und mehrere Minuten.

Verwendete Lösungen:

- 20× SSC
 - 3 M NaCl
 - 0,3 M Natriumcitrat-Dihydrat, pH 7,0

- DEPC-Wasser
 - 1000 ml H₂O_{dest.}
 - 1 ml Diethylpyrocarbonate (DEPC)

- RNA-Denaturierungspuffer
 - 500 µl Formamid
 - 162 µl Formaldehyd
 - 100 µl 10×MOPS-Puffer
- Hybridisierungspuffer
 - 22 ml Hybridisierungspuffer (aus „AlkPhos Direct Labelling Kit“ von Amershan Biosciences)
 - 0.5 M NaCl
 - 5 % Blockreagenz (aus „AlkPhos Direct Labelling Kit“ von Amershan Biosciences)
- Primärwaschpuffer
 - 6 M Harnstoff
 - 0.4 % SDS
 - 25 ml 20×SSC
 - ad 1000 ml DEPC-Wasser

4.2 Mikrobiologische Arbeiten

4.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli* und *Listeria monocytogenes*

*E. coli*s werden für Klonierungsarbeiten in LB- oder 2 YT-Medien herangezogen. Listerien dagegen werden in BHI-Medium kultiviert. Für die jeweilige Agarplatten werden den Medien 15 g Agar zugesetzt. Die Medien werden nach den unten aufgeführten Rezepten hergestellt und 20 min. bei 120 °C autoklaviert. Sind die Agarmedien unter 50 °C abgekühlt werden die entsprechenden Antibiotika (Tabelle 4.1) zur Selektion steril dazugegeben und anschließend werden die Platten gegossen.

- LB-Medium
 - 10 g Bacto-Pepton
 - 5 g Yeast-Extrakt
 - 10 g NaCl
 - ad 1000 ml H₂O_{dest.}
- 2 YT-Medium:
 - 16 g Bacto-Pepton
 - 10 g Yeast Extract
 - 10 g NaCl
 - ad 1000 ml H₂O_{dest.}
- BHI („brain heart infusion broth medium“)-Medium
 - 37 g BHI, ad 1000 ml H₂O_{dest.}

Die Antibiotika werden entweder in H₂O_{dest.} oder Ethanol gelöst, gegebenenfalls sterilfiltriert und bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert.

Tabelle 4.1 : Zusammensetzung der verwendeten Antibiotikas

| Antibiotikum | Stammlösung | Endkonzentration | Selektion | Kultivierung nach Transformation |
|--------------|--|------------------|----------------------|----------------------------------|
| Erythromycin | 100 mg/ml in 100 % Ethanol | 100 µg/ml | <i>E. coli</i> | 3h |
| | 5 mg/ml in 100 % Ethanol | 5 µg/ml | <i>Listeria spp.</i> | 6h |
| Tetracyclin | 20 mg/ml in 70 % Ethanol | 20 µg/ml | <i>E. coli</i> | 1h |
| | 5 mg/ml in 70 % Ethanol | 5 µg/ml | <i>Listeria spp.</i> | 3h |
| Ampicillin | 100 mg/ml H ₂ O _{dest.} | 100 µg/ml | <i>E. coli</i> | 1h |
| Penicillin G | 5 mg/ml in H ₂ O _{dest.} | 5 µg/ml | <i>Listeria spp.</i> | ca. 1h |

4.2.2 Herstellung von Glycerinstocks

E. colis wie auch *Listerien* werden Übernachten in den entsprechenden Medien hochgezogen. Am nächsten Tag werden den Kulturen steriles Glycerol (v/v) (25 % Endkonzentration) zugesetzt und bei -80 °C in Mikroröhren eingefroren.

4.2.3 Transformation von *Listeria monocytogenes*

Für die Transformation der isolierten und sequenzierten Plasmid-DNA in *Lm* Zellen, müssen die Bakterienzellen erst kompetent gemacht werden. *Listerien* besitzen keine natürliche Kompetenz wie andere Gram positive Bakterien, deshalb müssen sie durch den Einsatz von Penicillin G (Benzylpenicillin) kompetent gemacht werden. Dieses gehört zur Gruppe der β-Lactam-Antibiotika. Es hemmt die Quervernetzung der Bakterienzellwandpeptidoglykane in der Wachstumsphase.

4.2.3.1 Herstellung von elektrokompetenten *Lm*-Zellen

- eine *Listerien* ÜK wird 1:50 mit 50 ml BHI-Medium verdünnt
- nach Wachstum bis 0.4-0.5 OD_{600nm} erfolgt die Zugabe von 5 µg/ml Penicillin G (5 mg/ml in H₂O)
- fortführende Inkubation bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0.6-0.7
- nach 30 minütigem abkühlen auf Eis werden die Bakterienzellen bei 6000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert
- anschließend wird zweimal mit 1/10 Vol. an 3.5× SMHEM-Medium gewaschen
- schließlich wird das Bakterienpellet in 1/100 Vol. 3.5× SMHEM-Medium resuspendiert und in 100 µl-Portionen bei -80 °C eingefroren

Medium für die Herstellung von kompetenten *Lm*:

- 3.5× SMHEM-Medium
952 mM Saccharose

3.5 mM MgCl₂
7 mM HEPES
ad 200 ml H₂O_{dest}, pH 7.2, sterilfiltrieren (0.20 µm)

4.2.3 2 Transformation von *Lm* Zellen durch Elektroporation

Die Transformation in *Lm* wird auch mittels Elektroporation durchgeführt. Diese Elektroporation unterscheidet sich nicht von der Elektroporation bei *E. coli* (→ 4.1.1.13). Statt des 2 YT-Mediums wird BHI-Medium nach erfolgreicher Elektroporation verwendet. Die Zwischenzüchtung erfolgt ebenfalls bei 37 °C (bzw. 30 °C bei einem temperatursensitiven Vektor oder bei einem Lysiskassetten-enhaltenen Vektor) für 1 bis 6 h je nach Antibiotikaresistenz. Anschließend werden die Zellen kurz abzentrifugiert und auf den entsprechenden Antibiotikaplatten ausplattiert und für 1-3 Tage bei 37 °C (bzw. 30 °C) inkubiert. Auf Grund der nur mäßigen Transformations-Effizienz können mit dieser Methode zwar Plasmide, aber keine Ligationsansätze erfolgreich transformiert werden, d.h. eine direkte Klonierung mit *Listeria* als Wirt ist nicht möglich.

4.2.5 Austausch von Plasmiden in der Deletionsmutante *Lm* $\Delta trpS/ptrpS$

Da alle konstruierten pSP-Derivate (Erythromycin (Em)-Resistenz) die Transkriptionseinheit *trpS* enthalten, können sie in den Stamm *Lm* $\Delta trpS/ptrpS$ transformiert werden und mit dem ursprünglichen enthaltenen Plasmid *pflotrpS* (Tc-Resistenz) ausgetauscht werden, da unterschiedliche Resistenzmarker auf den Plasmiden zu finden sind. Dazu werden die pSP-Derivate in die Deletionsmutante *Lm* $\Delta trpS/ptrpS$ elektroporiert (→ 4.2.3.2) und anschließend werden die erhaltenen Transformanten mit dem Resistenzmarker Em der pSP-Derivat selektioniert. Anschließend wird eine erhaltene Em-positive Kolonie übernacht im Erythromycin-haltigen BHI-Medium kultiviert. Am nächsten Tag wird eine geeignete Verdünnung (10⁻⁶) der ÜK hergestellt und auf Em-haltige Platten ausplattiert. Diese wird dann für 1-2 Tage bei 37°C inkubiert. Es werden anschließend 12 Kolonien gepickt und parallel auf Tc-Platten und Em-Platten ausgestrichen. Klone, welche auf den Tc-Platten nicht gewachsen sind, haben das Plasmid *pflotrpS* verloren und werden nun als positive *Lm* $\Delta trpS/pSP$ -Derivate betrachtet.

4.2.6 Wachstumsverhalten von *Lm*

Um die erhaltenen neuen *Lm* Stämme zu charakterisieren werden Wachstumskurven nach folgender Anleitung erstellt:

- eine bei 37°C kultivierte *Listerien*-ÜK wird 1:50 in 50 ml BHI ohne Antibiotikazusätze verdünnt und in einem Kolben bei 37°C im Schüttler bei 190 rpm inkubiert
- in regelmäßigen Abständen wird die optische Dichte der Kultur am Spektralphotometer bei 600 nm bestimmt und notiert, bis sich die *Listerien* in einer spät-logarithmischen Phase oder sogar in der stationären Phase befinden
- anhand der gemessenen Werte kann eine Wachstumskurve (optische Dichte/Zeit) erstellt werden

- alternativ kann bei einer optischen Dichte von 1,0 die Bakterienkultur für spätere Isolierungen von RNA oder Proteinen oder die Herstellung von Infektionsaliquots geerntet werden.

4.2.7 Herstellung von Infektionsaliquots

Für die Herstellung von Bakterienaliquots für eine Infektion von eukaryotischen Zellen oder von Mäusen wurden die *Lm* Stämme aus den jeweiligen Glycerolstocks frisch auf BHI-Platten ausgestrichen. Am nächsten Tag kann von einer Einzelkolonie ausgehend eine ÜK hergestellt werden. Die Stämme werden wie oben beschrieben angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 1,0 kultiviert. Anschließend muss auf Eis weitergearbeitet werden, so dass ein weiteres Wachstum verhindert wird. Die Bakterienzellen werden bei 6000 rpm und 4 °C für 10 min pelletiert und zweimal mit einer ausreichenden Menge an steriler 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen. Stellt man Infektionsaliquots für die Mäuse her ist es ratsam, ab dem Schritt des Pelletierens Endotoxin-frei und sehr steril zu arbeiten. Das heißt es dürfen nur neue Endotoxin-freie Materialien (z.B. Spitzen, Greiner, Pipetten, usw.) verwendet werden. Auch die 0,9%-ige NaCl-Lösung sollte aus Ampuwa-Wasser hergestellt und anschließend in ein Endotoxin-freies Gefäß sterilfiltriert werden. Nach den Waschschritten wird das Pellet in 10 ml eiskalter 0,9%NaCl-Lösung mit 20 % Endkonzentration Glycerol resuspendiert, zu 1 ml Portionen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Einen oder zwei Tage vor der Infektion sollte jeweils ein Aliquot aufgetaut werden, um die Bakterienanzahl pro ml durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen zu ermitteln. Die Bakterienanzahl errechnet sich dabei wie folgt:

- $\text{Bakterienanzahl/ml} = \text{Anzahl der Kolonien} \times \text{Verdünnungsstufe} \times 10$

4.2.7 Konstruktion von *Lm* Deletionsmutanten

Deletionsmutanten von *Lm* wurden mit Hilfe der homologen Rekombination hergestellt. Dafür wurde der temperatursensitive (ts) Vektor pLSV101 verwendet. Der Vektor trägt eine Em-Antibiotikaresistenz und einen ts-Origin. Aufgrund seines ts-Origin kann der Vektor in *Listerien* nur bei 30 °C nicht aber bei 42 °C replizieren. Befinden sich nun auf diesem Vektor zusätzliche zum *Listerien*-Genom homologe Bereiche, so kann eine Integration des Vektors ins bakterielle Genom bei 42 °C und dem Selektionsdruck des Antibiotikums Em erfolgen. Die homologen Bereiche werden so gewählt, das sie stromaufwärts (a) und stromabwärts (b) flankierend zu dem deletierenden Gens liegen. Die homologen Bereiche sollten dabei eine Größe von ca. 300-500 Basen haben. Je größer der Bereich ist, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination. Diese Bereiche werden per PCR amplifiziert, ligiert oder mit Hilfe der rekombinanten PCR fusioniert, anschließend mit Enzymen der Wahl verdaut und schließlich in die „multiple cloning site“ des linearisierten Vektors pISV101 ligiert. Diese fertigen Deletionsplasmide werden durch Elektroporation (→ 4.2.3.2) in die *Lm* Ausgangsstämmen gebracht. Selektioniert werden positive Klone anhand der Em-Resistenz bei 30°C. Nach dem Erhalt eines positiven Klons wird dieser übernacht bei 30 C in einem Em-haltigem BHI-Medium kultiviert und am nächsten Tag werden die Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-4} auf Em-Platten ausplattiert und bei 43 °C inkubiert. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Integration des Vektors ins Chromosom. Dabei kann das Plasmid

über den Bereich a oder Bereich b ins Chromosom homolog integrieren. Der Nachweis der Integration ins Chromosom kann per PCR erbracht werden. Der eine Primer hybridisiert mit Sequenzen auf dem Chromosom aber außerhalb des homologen Bereichs und der andere mit Sequenzen des Plasmids. Ein positiver Integrant wird anschließend mehrmals (0- bis 30-mal) bei 30 °C passagiert. Von jeder Passage wird eine 10^{-6} -Verdünnung auf eine Platte ohne Antibiotikum ausplattiert. Die erhaltenen Klone werden zunächst auf eine Tc-Platte und parallel dazu auf eine Em-Platte ausgestrichen. Bakterien die Em sensitiv sind und somit das Em-Plasmid durch eine zweite homologe Rekombination verloren haben, werden zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Diese Erythromycin-sensitiven aber Tc-positiven Klone werden per PCR auf Deletion des Zielgens überprüft. Die fertigen Deletionsmutanten können zusätzlich durch nicht Vorhandensein des Proteins per Western Blot Analyse identifiziert werden.

4.3 Proteinanalytische Methoden

4.3.1 Präparation von bakteriellen Proteinen für SDS-PAGE

Um eine ausreichende Menge an listeriell-exprimierten Proteinen präparieren zu können müssen *Listerien* erst bis zu einer spätlogarithmischen Wachstumsphase von 1,0 OD_{600nm} kultiviert werden (→ 4.2.6). Anschließend werden die Kulturen bei 6000 rpm und 4 °C über 10 min abzentrifugiert. Aus dem Kulturüberstand lassen sich mittels TCA-Fällung exportierte Proteine isolieren, wohingegen zelluläre und zellwandverankerte Proteine aus dem Zellpellet isoliert werden.

Exportierte Proteine

- der Kulturüberstand wird vorsichtig abgenommen und mit TCA (Endkonzentration 10 %, v/v) für 1h auf Eis gefällt
- anschließend werden die gefällten Überstandsproteine bei 6000 rpm und 4 °C für 30 min abzentrifugiert
- der gesamte Überstand wird verworfen, das Pellet wird sofort mit eiskaltem Aceton gewaschen und abzentrifugiert
- das resultierende Pellet wird bei RT kurz angetrocknet, schließlich in 100-facher Ankonzentration in 2×Laemmli aufgenommen und für 7 min bei 110 °C aufgekocht

Oberflächenproteine

- das Zellpellet wird in 1×PBS resuspendiert und abzentrifugiert
- anschließend wird das gewaschene Pellet umgehend in 1.8 ml 1×PBS mit 1 % SDS resuspendiert, in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt und bei 37 °C unter leichtem Schwenken inkubiert
- 30 min später wird es bei RT und 14 000 rpm abzentrifugiert
- der Überstand wird vorsichtig abgenommen, für 1h mit TCA (10 % Endkonzentration, v/v) auf Eis gefällt und bei 4 °C und 14000 rpm für 20 min abzentrifugiert

- schließlich werden die Proteine in 1000facher Ankonzentration in 2×Laemmli gelöst und für 7 min bei 110 °C aufgeköcht

Intrazelluläre Proteine

- das erhaltene Zellpellet aus der Präparation der Oberflächenproteine wird in 1 × PBS resuspendiert und abzentrifugiert
- anschließend wird es in 2×Laemmli entsprechend einer 100facher Ankonzentration resuspendiert, in Lysis Matrix B Tubes überführt und insgesamt 3 mal für 45 sec auf Geschwindigkeitsstufe 6.5 geschredert (zwischen den Durchgängen werden die Proben auf Eis abgekühlt)
- danach werden die Proben für 15 min bei 14000 und RT abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup überführt und bei 110 °C für 7 min aufgeköcht

Verwendete Lösungen

- 2×Laemmli
 - 100 mM Tris-HCl, pH 6.8
 - 20 % (v/v) Glycerol
 - 10 % (v/v) β-Mercapthoethanol
 - 4 % (w/v) SDS
 - 0,005 % (w/v) Bromphenolblau
- 100 % Trichloressigsäure (TCA)
- eiskaltes Aceton
- gesättigte Tris-Lösung (Zugabe bei Veränderung des pHs, Farbumschlag)

4.3.2 Präparation von eukaryotischen Proteinen für SDS-PAGE

2 oder 3 Tage nach Infektion werden die eukaryotischen Zellen in den 60 mm Kulturschalen lysiert und die Proteine isoliert.

- das Kulturmedium wird abgezogen und der Zellrasen wird einmal mit 1×PBS gewaschen
- der Monolayer wird anschließend mit 400 µl 2×Laemmli versetzt, von der Schale vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgeschabt und die Zellsuspension wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt
- danach wird die Suspension 30-mal durch eine 23 G Kanüle gepresst und sechsmal abwechselnd im flüssigen Stickstoff eingefroren und im heißen Wasser aufgetaut
- schließlich wird das Lysat bei 110 °C für 5 min aufgeköcht

4.3.3 Immunpräzipitation

Unter einer Präzipitation versteht man das Ausfällen eines löslichen Antigens durch einen spezifischen Antikörper. Es entsteht ein Antigen-Antikörper-Komplex der durch die Protein A Sepharose gebunden werden kann. Protein A, aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus*, erkennt die meisten Typen von Immunglobulinen (Ig) verschiedener Spezies und bindet an die F_c-Region der Igs. Es kann deshalb zur Reinigung von Immunglobulinen oder Antigen-Antikörper-Komplexen eingesetzt werden. Ein Milligramm des gereinigten und als Pulver vorliegenden Proteins bindet ca. 9-11 mg IgG. Anschließend wird der Komplex aus Protein A und Antigen-Antikörper-Komplex gewaschen um nicht gebundene Antigen-Antikörper-Komplexe zu entfernen. Danach werden die einzelnen Komponenten durch eine SDS-PAGE gelöst und ihrer Größe nach aufgetrennt. Durch Autoradiographie lässt sich schließlich das Antigen sichtbar machen.

- infizierter Zellrasen wird mit eiskaltem 1×PBS gewaschen
- Zugabe von 1 ml eiskaltem modifiziertem RIPA-Puffer zu 10⁷ Zellen
- anschließend werden die Zellen mittels eines vorgekühlten Pasteurpipette abgeschabt, in ein neues Eppendorf-Tube überführt und für 10 min bei 4 °C in einem Vertikalrad (Rollordrum™) inkubiert
- Zelllysat wird dann bei 14000 rpm und 4 °C für 5 min abzentrifugiert und in ein neues Eppendorf-Tube überführt
- Konzentration der Proteine werden nach Bradford (→ 4.3.4) bestimmt
- Zelllysat wird nach der Proteinkonzentrationsbestimmung zu 1 mg/ml mit 1×PBS verdünnt, mit 25 µg des Antikörpers versehen und über Nacht bei 4 °C auf dem Vertikalrad inkubiert
- am nächsten Tag werden 250 µg Protein A Sepharose in 2 ml PBS aufgequillt (50 V-%)
- anschließend erfolgt die Zugabe von 100 µl der aufgequillten Sepharose zu dem nun entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex und eine weitere Inkubation erfolgt über Nacht bei 4 °C
- abschließend wird zweimal mit kaltem 1×PBS gewaschen, in 2×Laemmli resuspendiert und für 5 min bei 110 °C aufgeköcht

Verwendete Puffer

- modifizierter Radioimmunpräzipitations-Puffer (RIPA-Puffer)
 - 50 mM Tris-HCl, pH 7.4
 - 1 % NP-40
 - 0,25 % Na-deoxycholate
 - 150 mM NaCl
 - 1 mM EDTA
 - 1 mM PMSF
 - je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin
 - 1 mM Na₃VO₄
 - 1 mM NaF

4.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde mittels der Methode nach Bradford durchgeführt. Dieser Test ist vor allem wegen seiner Unempfindlichkeit gegenüber störenden Ionen und Reduktionsmittel gut geeignet. Bei der Bindung des „Coomassie Brilliant Blue G250“-Farbstoffes an Proteine im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. Die Absorptionzunahme bei 595 nm ist hierbei ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Das Verfahren eignet sich um Proteinmengen im Bereich von 1-10 µg zu bestimmen. Die Stammlösung für den Bradford-Assay stammt von der Firma BioRad und setzt sich aus dem genannten Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure zusammen. Die Proteinlösungen werden unverdünnt eingesetzt. Außerdem wird mit BSA eine Standardreihe der Konzentration 10; 8; 6; 4; 2; 1 und 0 µg/ml vorbereitet. Das Bradford-Reagenz wird vor der Messung 1:5 in 1 ml destilliertem Wasser verdünnt. Von den Standards und Proben werden je 1 µl auf einen Milliliter verdünntes Bradford-Reagenz gegeben. Die dabei entstehende Farbänderung wird im Spektralphotometer bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen ergeben sich durch rechnerischen Vergleich der optischen Dichte der Proben mit der Eichkurve.

4.3.5 Western Blot

Als Western Blot wird eine Methode bezeichnet, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (→ 4.3.5.1) aus einem Trenngel auf geeignete Trägermembranen ihrer Größe nach transferiert werden (Blotting, → 4.3.5.2.1). Hierbei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine auf den Filtern immobilisiert werden und dann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können. Dabei wird der Antikörper-Antigen-Komplex durch Zugabe eines sekundären Antikörpers sichtbar gemacht, der an ein Enzym, meistens Peroxidase gekoppelt ist, welches ein luminogenes Substrat zur Lichtemission anregt und dies dann auf einen Röntgenfilm sichtbar macht (→ 4.3.5.2.2). Mit dieser Methode können exprimierte Proteine nachgewiesen werden.

4.3.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine in Gegenwart eines Überschusses von Natriumdodecylsulfat (englisch sodium dodecyl sulfate, SDS) und Denaturierungsreagenz β-Mercapthoethanol elektrophoretisch aufgetrennt. Das negativ geladene SDS lagert sich in konstantem Gewichtsverhältnis an die Proteine an. Dies führt mehr oder weniger zum Ausgleich von Ladungsdifferenzen zwischen unterschiedlichen Proteinen, da pro gebundenes SDS-Molekül jeweils zwei negative Ladungen zur Gesamtladung beitragen. Dadurch werden die positiven Ladungen der Proteine kompensiert, so dass diese jetzt zur Anode wandern können. Gleichzeitig werden die Proteine vollständig denaturiert und können so in einem Gel geeigneter Porosität entsprechend ihrer Molmasse wandern. Hier wird auch ein Laemmli-System verwendet, bei der die aufzutragenden Proben zunächst in einer Sammelgelschicht konzentriert werden und von dort in das eigentliche Trenngel hineinwandern. Das SDS des Laemmli zerstört nichtkovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen. β-Mercapthoethanol, ebenfalls im Probenpuffer enthalten, zerstört mögliche Disulfidbrücken. Dabei richtet sich die gewählte Prozentualität des Trenngels

nach der Größe des nachzuweisenden Proteins. Die verwendeten Gele sind in nachfolgender Tabelle beschrieben.

Zuerst wird das Trenngel in die Gelapparatur eingefüllt und mit Methanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation (1 h) wird das Methanol abgekippt, das Sammelgel hinzugefügt und die Kämme für die Formung der Taschen eingesteckt. Nach vollständiger Polymerisation werden die Kämme vorsichtig entfernt und die Taschen anschließend mit dest. Wasser ausgespült.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Page Gele

| | 8% Trenngel (ml) | 10% Trenngel (ml) | 12% Trenngel (ml) | 5% Sammelgel (ml) |
|------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| H ₂ O | 13.9 | 11.9 | 9.9 | 6.8 |
| 30%ige Acrylamidlösung | 8.0 | 10.0 | 12.0 | 1.7 |
| 1.5 M Tris/ HCL pH 8.8 | 7.5 | 7.5 | 7.5 | |
| 1 M Tris/ HCL pH 6.8 | | | | 1.25 |
| 10 % SDS in H ₂ O | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.1 |
| 10 % APS in H ₂ O | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.1 |
| TEMED | 0.018 | 0.012 | 0.012 | 0.01 |

Die fertigen Gele werden nun in den Tank der Apparatur gestellt und dieser mit 1× Elektrophorese-Puffer befüllt. Hierbei ist zu beachten, dass sich unter dem Gel keine Bläschen ansammeln, die das elektrische Feld verformen könnten. Die Proben und der Molekulargewichtsstandard werden aufgetragen und ca. 2 h bei einer Spannung von 200 V getrennt. Anschließend wird die Apparatur auseinander gebaut, die Gele vorsichtig entnommen, die Sammelgele abgeschnitten und dann kurz in H₂O gewaschen. Anschließend können diese im halbtrockenen Western Blot Verfahren verwendet werden.

- 10 × Elektrophorese-Puffer
 - 30 g/L Tris Base
 - 144 g/L Glycin
 - 10 g/L SDS

4.3.5.2 Proteinanalyse im Western Blot

4.3.5.2.1 Transfer von Proteinen auf eine Nylonmembran (Blotten)

Beim Western Blot werden die auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Der Transfer der Proteine erfolgt nach der „Semidry Electroblotting“-Methode mit Hilfe einer Graphit-Blot-Kammer. Die Graphitplatten der Kammer werden mit dest. Wasser befeuchtet. Nacheinander werden zugeschnittene Whatmann Papiere, die vorher in den Blotpuffer eingelegt wurden, auf die Blotting-Apparatur nach Skizze in nachfolgender Abb. 4.2 aufgelegt. Auch die Nitrozellulose-Membran wird mit dem Blotpuffer angefeuchtet, bevor

sie aufgelegt wird. Der gesamte Aufbau muss luftblasenfrei sein, da sonst nur ein unvollständiger Transfer erfolgt. Die Spannungsquelle wird so eingestellt, dass pro cm^2 Gel ein Strom von etwa 0,8 mA fließt.



Abb. 4.2: Schematische Skizze des Aufbaus einer Blotting-Apparatur

- Blotpuffer
 - 5.8 g/L Tris
 - 2.9 g/L Glycin
 - 0.37 g/L SDS
 - 20 % (v/v) Ethanol

4.3.5.2.2 Immundetektion von Proteinen

Die Membran wird für 2 h bei Raumtemperatur mit Blocking-Reagenz inkubiert, damit alle unspezifischen Bindungsstellen, die störende Hintergrundsignale verursachen könnten, abgesättigt sind. Das Blocking-Reagenz wird danach abgegossen, der erste Antikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird die Antikörperlösung entfernt und die Membran sorgfältig mit 1×T-PBS gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene primäre Antikörper zu entfernen. Daraufhin erfolgt die 1-2 stündige Inkubation mit dem zweiten Merrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Lösung entfernt und die Membran wiederum mit 1×T-PBS intensiv gewaschen. Die dekorierte Nitrozellulose-Membran wird nun zwischen zwei Plastikfolien gelegt und einer ECL (Enhanced Chemoluminescence) Reaktion unterworfen. Der ECL-Kit enthält Luminol, welches ein Substrat für die Merrettichperoxidase darstellt. Nach Oxidation geht dies in einen angeregten Zustand über, wobei Licht emittiert wird. Dazu wird 1 ml der 1:1 vermischten ECL-Lösungen über den Blot gegeben. Überschüssige Lösung wird vollständig entfernt und der Blot wird in eine Expositionskassette plaziert. Die leuchtenden Banden können durch Auflegen eines Röntgenfilms dokumentiert werden. Die Expositionszeit variiert dabei je nach Stärke des Signals zwischen wenigen Sekunden und mehrere Minuten.

- Blocking-Reagenz
 - 5 % (w/v) Magermilch in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
- 10×PBS (pH 7.0)
 - 80 g/L NaCl
 - 11.6 g/L Na_2HPO_4
 - 2.0 g/L KH_2PO_4
 - 2.0 g/L KCl

- 1×T-PBS
0.05 % (v/v) Tween 20 in 1×PBS

Tabelle 4.3: Im Western Blot verwendete Primärantikörper

| Antigen | Wirt | Verdünnung in 1 × PBS |
|---------|-----------|-----------------------|
| ActA | Kaninchen | 1:1000 |
| Hol118 | Kaninchen | 1:1000 |
| IE1 | Maus | 1:1000 |
| InIA | Kaninchen | 1:5000 |
| InIB | Kaninchen | 1:5000 |
| OVA | Kaninchen | 1:500 |
| Ply118 | Kaninchen | 1:500 |

Der polyklonale Anti-OVA Antikörper wurde zusätzlich durch S. Pilgrim affinitätsgereinigt. Dieser gereinigte Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

Tabelle 4.4: Im Western Blot verwendete Sekundärantikörper

| Anti | Wirt | Verdünnung in 1 × PBS |
|-----------|-------|-----------------------|
| Kaninchen | Ziege | 1:8000 |
| Maus | Ziege | 1:4000 |

4.4 Arbeiten mit Zellkulturen

Bei allen Zellkulturmethoden wird gründlich, vorsichtig, steril und konzentriert gearbeitet, so dass eine Kontamination ausgeschlossen werden kann.

4.4.1 Routinemethoden zur allgemeinen Handhabung und Subkultivierung von Zellen

Alle verwendeten eukaryontischen Zelllinien werden im begasten Brutschrank bei 37 °C in einer humiden Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 % in entsprechenden vorgewärmten Medien (→ 2.11) kultiviert. Die Eukaryontenzellen wachsen als Monolayerkulturen in Gewebeschalen oder Flaschen. Sie benötigen für ihr Wachstum und zur Vitalitätserhaltung einen regelmäßigen Wechsel des Mediums, da bestimmte Bestandteile des Mediums entweder von den Zellen metabolisiert werden oder bei 37 °C im Laufe der Zeit verfallen. Die Intervalle der Medienerneuerung und der Subkultivierung variieren von Zelllinie zu Zelllinie und sind abhängig von Metabolismus und Wachstumsgeschwindigkeit. Da alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (→ 2.11) schnell wachsende Kulturen darstellen, erfolgt der Mediumwechsel alle 2-3 Tage. Zellen, die zu einem konfluenten Monolayer herangewachsen sind, befinden sich in engem Kontakt zueinander und haben keinerlei freie Oberfläche zum Wachsen zur Verfügung. Im weiteren Verlauf runden sich die Zellen ab und verlieren den Kontakt zum Untergrund, sie altern. Ein Waschschrift in diesem

Zustand hätte einen großen Zellverlust zur Folge. Deshalb erfolgt die Subkultivierung, nach optischer Überprüfung der Zelldichte, ca. alle zwei bis drei Tage.

4.4.1.1 Mediumwechsel bei Monolayerkulturen

Das verbrauchte Medium wird aus der Kulturflasche entfernt und verworfen. Die gleiche Menge frisches, vorgewärmtes Medium wird nach einmaligen Waschen mit 1×PBS zugefügt. Die Kultur wird weiter inkubiert.

- 20×PBS für Zellkultur
 - 160 g NaCl
 - 4 g KCl
 - 23 g Na₂HPO₄ (2×H₂O)
 - 4 g KH₂PO₄
 - ad 1000 ml H₂O_{dest.}

4.4.1.2 Subkultivierung von Monolayerkulturen

Subkultivierung der Zellen erfolgt mittels Passagieren der Zellen, d. h. die Zellen im alten Kulturgefäß werden in Suspension gebracht und in neue Kulturgefäße verdünnt überführt.

Der erste Schritt ist das Ablösen adhärennder Zellen vom Untergrund des Kulturgefäßes. Die weit verbreiteste Methode ist dabei der Gebrauch von Trypsin/EDTA. Dabei ist zu beachten, dass die Zellen nicht zu lange mit der Trypsinlösung in Kontakt stehen, da längere Einwirkungszeiten die Lebenszeit der Zellen irreversibel schädigen können. Vor der Trypsin-Behandlung wird das alte Medium verworfen, die Zellen mit warmen 1×PBS gewaschen. Schließlich wird eine kleine Menge an Trypsin (z.B.: 1.0-1.5 ml pro 200 ml Flasche) dazugegeben und verteilt, so dass sich ein dünner Flüssigkeitsfilm über den Monolayer legt. Die Kultur inkubiert nun bei 37 °C für ca. 3-5 min. Nach der Inkubation gleiten die Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche ab und durch wiederholtes, vorsichtiges Abspülen der noch anhaftenden Zellen mit frischem Medium werden die Zellen suspendiert. Die so erhaltene Zellsuspension wird um den Faktor 2-8 verdünnt, in dem sie in eine neue Flasche mit frischem Medium überführt wird. Anschließend wird weiter bei 37 °C inkubiert. Die Zellen adhären im Verlauf der nächsten 4-6 h und dürfen in dieser Zeit keinen Scherkräften ausgesetzt werden.

4.4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eukaryontenzellen können über längere Zeit in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt werden. Diese Lagerung bewahrt die Zellen vor Kontamination und vor Variabilität durch Subkultivierung. Die schädigende Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die partielle Dehydratisierung des Zytoplasmas werden durch ein geeignetes Gefrierschutzmittel, hier Dimethylsulfoxid (DMSO), verhindert. Ausgangsmaterial zum Einfrieren ist die Zellsuspension im jeweiligen Kompletmedium mit 10 % fetalem Kälberserum. Die Zellsuspension wird wie schon beschrieben, durch Trypsinbehandlung erhalten. Die Zellen werden in 9 ml Medium resuspendiert

und langsam auf Eis abgekühlt. Der Zellsuspension auf Eis wird 1.2 ml DMSO hinzugefügt, so dass sich eine 12 %ige Endkonzentration von DMSO einstellt. Mit 1–1.5 ml der gut gemischten Suspension werden Kryoröhrchen beschickt. Diese werden nach 24-stündiger Abkühlung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem geschlossenen Styroporbehälter in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wird die Zellsuspension im Kryoröhrchen im Wasserbad bis zum Flüssigwerden des Mediums erwärmt. Sofort nach dem Auftauen wird der Inhalt des Röhrchens zügig in eine neue Zellkulturflasche mit Medium überführt. Am nächsten Morgen wird das Medium gewechselt. Ein erstes Passagieren erfolgt nach Erreichen der Konfluenz.

4.4.1.4 Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Färbung

Färbt man Zellsuspensionen 1:1 mit Trypanblau, so kann die Lebendzellzahl bestimmt werden. Ein Tropfen der angefärbten Zellsuspension wird in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben und lichtmikroskopisch ausgewertet. Der Farbstoff dringt dabei in tote Zellen schnell ein und färbt sie blau. Lebende Zellen dagegen nehmen den Farbstoff nur sehr langsam auf. Sie besitzen eine kugelige Gestalt und man kann sie auf Grund ihrer helleren und leuchtenden Erscheinung gut vom blauen Hintergrund unterscheiden. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wird die Anzahl der lebenden Zellen in drei Großquadraten gezählt, gemittelt und wie folgt berechnet:

Lebendzellzahl/ ml = Lebende Zellen/Großquadrat x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor

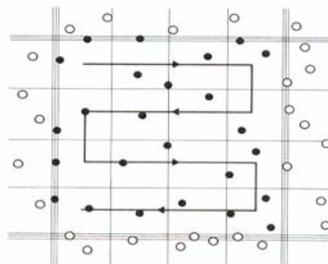


Abb. 4.2: Ausgezählte Zellen in einem Quadrat der Zählkammer

Die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer besteht aus mehreren Großquadraten, die jeweils aus 16 Feldern bestehen. Es werden mindestens drei Großquadrate ausgezählt und deren Mittelwert berechnet. Die Zellzahl berechnet sich nun aus dem Produkt des Mittelwertes, dem Faktor der Zählkammer (5000) und dem Volumen der Zellsuspension.

4.4.2 Spezielle Arbeiten mit den Zellen

4.4.2.1 Infektionen mit *Lm*

In den Infektionsversuchen werden Listerien in einer bestimmten MOI („multiplicity of infection“; Verhältnis der Bakterien zur ausgesäten Zellzahl) in serumfreiem Medium auf einen semikonfluenten Zellrasen gebracht. Da es sich hier bei den verwendeten Zelllinien auch um nicht-professionelle Phagozyten handeln kann, werden die Bakterien durch selbst induzierte Phagozytose

aufgenommen. Dagegen haben professionelle Phagozyten gemäß ihrer natürlichen Funktion eine erhöhte Aufnahme an Bakterien, was beachtet werden muss. Auch sollte das Infektionsmedium ausplattiert werden, so dass die exakte Bakterienanzahl pro Zelle mit der theoretischen Anzahl verglichen werden kann. Nach einstündiger Infektion wird Gentamycin zugegeben, wodurch alle extrazellulären Bakterien abgetötet werden. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass sekundäre Infektionen durch das Abtöten extrazellulärer Bakterien vermieden werden. In Versuchsansätzen, die nur die Adhärenz der Bakterien testet, wird auf die Zugabe des Antibiotikums verzichtet. Nach einstündiger Inkubation mit Gentamycin wird die Lebendzellzahl durch Ausplattieren der Verdünnungsstufen bestimmt. Auf diese Weise ist eine Aussage über das Invasions- und Adhärenzverhalten möglich. Dafür werden die Zellen einer 5 sec Ultraschallbehandlung unterzogen. Die Lebendzellzahl pro Infektionsansatz wird mit geeigneten Verdünnungsstufen bestimmt. Ist die Bakterienanzahl im Infektionsansatz und in den Infektionsmedien bekannt, kann die absolute Infektionsrate des Stammes errechnet werden (siehe Formel). Die relative Infektionsrate lässt sich dadurch bestimmen, dass neben den zu untersuchenden Stämmen auch ein bekannter Kontrollstamm parallel eingesetzt wurde (siehe Formel).

Intrazelluläre Bakterien werden nicht nur anhand ihrer Infektions- und Adhäsionsfähigkeit untersucht und ausgewertet, sondern auch durch Markierung mit einem EGFP-Expressionsplasmid, durch Giemsa-Färbung oder durch Immunfluoreszenz-Färbung unter dem Mikroskop.

$$\text{absolute Infektionsrate (\%)} = \frac{\text{Anzahl der Bakterien im Infektionsansatz}}{\text{Anzahl der Bakterien im Infektionsmedium}} \times 100$$

$$\text{relative Infektionsrate (\%)} = \frac{\text{absolute Infektionsrate des Stammes xy}}{\text{absolute Infektionsrate des Referenzstammes}} \times 100$$

4.4.2.2 Aussäen der Eukaryontenzellen

Um die richtige Zelldichte für Invasionsversuche oder Adhärenzversuche zu bekommen, müssen die Zellen am Vortag des Versuchs in der richtigen Zellzahl in 12- oder 24-well Platten ausgesät werden. Die einzusäende Zellzahl wird nach Größe des Napfes und der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie bestimmt. Hierbei werden die Zellen nach einmaligem Waschen mit 1×PBS trypsinisiert und in 14 ml Kompletmedium aufgenommen. Nach gutem Resuspendieren wird die Zellzahl mit der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt

Anschließend wird, je nach Zelltyp, die jeweilige Zellzahl eingestellt, so dass pro Napf in z.B. einer 24-Napfplatte 1ml einer $1,5 \times 10^5$ Zellsuspension ausgesät werden kann. Pro Versuchsansatz werden für jede Probe jeweils immer drei Nöpfe mit Zellen bestückt (dreifacher Ansatz).

4.4.2.1.2 Adhärenztest

Bei dieser Analyse wird die Adhärenzfähigkeit der Bakterien an die verwendeten Zellen getestet. Bevor der Versuch gestartet wird, wurde kontrolliert, ob der ausgesäte Zellrasen in jedem Napf konfluent ist. Anschließend werden die Bakterienaliquots auf Eis aufgetaut und zu einer gewünschten MOI in serumfreien RPMI verdünnt. Die Zellen werden mit 1×PBS/Ca²⁺/Mg²⁺-Lsg. gewaschen, Bakterien werden in der gewünschten MOI auf den Zellrasen gebracht. Die Zellen inkubieren für 30 min bei 37 °C (in diesem Zeitraum findet die erste Assoziation der Bakterien mit den Zellen statt) und anschließend wird fünfmal mit 1×PBS/Ca²⁺/Mg²⁺-Lsg gewaschen um sicher zu stellen, das freie nicht adhärenzte *Listerien* entfernt werden. Der Zellrasen wird mit 1 ml eiskaltem Wasser versetzt und anschließend werden die Zellen durch eine Ultraschallbehandlung lysiert. Es werden geeignete Verdünnungsreihen pro Napf erstellt, die anschließend für die Bestimmung der Bakterien-Lebendzellzahl auf BHI-Platten ausplattiert werden.

- 20×MgCl₂/CaCl₂-Lsg.
 - 2 g MgCl₂ (6 × H₂O)
 - 2 g CaCl₂ (2 × H₂O)
 - ad 1000 ml H₂O_{dest.}
- 1×PBS/Ca²⁺/Mg²⁺-Lsg.
 - 1/20 20×PBS
 - 1/20 20×MgCl₂/CaCl₂
 - ad 1000 ml H₂O

4.4.2.1.3 Invasionstest und Replikationsstudien

Im Invasionstest soll die Invasionsfähigkeit der einzelnen Bakterienstämme mittels eines „Gentamicin-survival assays“ untersucht werden.

Eukaryontenzellen werden am Vortag der Infektion in 12- oder 24-well Platten ausgesät und am nächsten Tag auf Semikonfluenz hin überprüft. Die Bakterienaliquots werden aufgetaut, auf die gewünschte MOI in serumfreiem Kulturmedium verdünnt und auf den Zellrasen gegeben. Eine Stunde später wird das Infektionsmedium verworfen, die Zellen werden einmal mit 1×PBS/Ca²⁺/Mg²⁺-Lsg. gewaschen und 1 h mit 100 µg/ml Gentamycin im Kulturmedium inkubiert. Die Zugabe von 100 µg/ml Gentamycin-haltigem Medium wird als Infektionszeitpunkt 0 angesehen. Um das Antibiotikum gründlich zu entfernen, wird zweimal mit einmal mit 1×PBS/Ca²⁺/Mg²⁺-Lsg. gewaschen. Die Zellen werden nun in 1 ml kaltem Wasser aufgenommen und mittels Ultraschall für 5 sec lysiert. Die Lebendzellzahl der Bakterien wird durch ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt.

Wird auch das Replizieren der Bakterien in den Wirtszellen untersucht, so wird nach der einstündigen Inkubation mit 100 µg/ml Gentamycin im Kulturmedium, dieses Medium mit einem 15 µg/ml Gentamycin-haltigen Kulturmedium ausgetauscht und für weitere Stunden inkubiert. Die Infektion kann nun zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt werden, um die Lebendzellzahl der Bakterien durch Ausplattieren zu bestimmen.

4.4.2.2 Transfektion von Zellen

Die Transfektion ist eine Methode mit deren Hilfe man heterologe DNA in Säugerzellen einschleußen kann. Im Gegensatz zur bakteriellen Transformation wird die DNA in der Regel nicht „nackt“ in die Säugerzelle eingebracht, sondern in Form von Präzipitaten, Komplexen mit Polymeren oder verpackt in Lipidvesikel. In dieser Arbeit werden kationischen Lipid-Reagenzien zur Transfektion eingesetzt. Diese bilden in wässriger Lösung kleine (100-400 nm), von einer einfachen Membran umgebene Liposomen, deren Oberfläche positiv geladen ist. Diese kationischen Liposomen bilden aufgrund der unterschiedlichen Ladungen einen stabilen Komplex mit der DNA. Liposomen werden durch Endocytose aufgenommen. In dieser Arbeit wurde das LipofectAMINE PLUS Reagent der Fa. Invitrogen verwendet und die Transfektion wurde nach Anleitung des „LipofectAMINE PLUS Reagent Transfection Protocol“ durchgeführt.

4.4.2.3 Färben von Zellen mit Giemsa

Die Giemsa-Färbung war ursprünglich eine nach der Romanowsky-Färbung modifizierte Differentialfärbung für methanolfixierte Blut- und Knochenmarkausstriche und zytologisches Material. Die Giemsa-Lösung besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid gelöst, in Methylalkohol mit Glycerin als Stabilisator.

Zellkerne erscheinen in gefärbten Ausstrichen durch eine Komplexbildung der Farbstoffe mit der DNA purpurrot. Das Zytoplasma wird meist bläulich dargestellt. Parasiten- bzw. Protozoen-Kerne erscheinen leuchtend rot, Zytoplasma von Lymphozyten blau, Erythrozyten blassrot und Blutplättchen blau mit violetter Innenkörper.

Listerien erscheinen nach einer Giemsa-Färbung im Lichtmikroskop als dunkel-violette Stäbchen, wobei eine intrazelluläre Lokalisation der Bakterien nur bedingt möglich ist. Infizierte Zellen wurden folgendermaßen mit der Giemsa-Lösung angefärbt:

- infizierte Zellen auf Deckgläschen werden mit 1xPBS pH 7.4 gewaschen
- für 5 min bei RT mit 100 % Methanol fixiert
- anschließend lässt man das Präparat lufttrocknen
- das Präparat wird mit einer verdünnten Giemsa-Farblösung (1:20 mit H₂O_{dest.}) für 20-30 min überschichtet, mit 1xPBS pH 7.4 vorsichtig gespült und schließlich bei RT getrocknet

4.4.2.4 Durchflußzytometrie von EGFP-exprimierenden Zellen

Der Transfer von EGFP-Expressionsplasmiden durch Listerien in Eukaryontenzellen kann quantitativ mit Hilfe der Durchflußzytometrie ausgewertet werden. Dafür werden die Wirtszellen mit einer gewünschten MOI der Bakterien für eine Stunde infiziert. Anschließend wird mit 100 µg/ml Gentamycin im Kulturmedium inkubiert, der Zellrasen wird zweimal mit 1xPBS/Ca²⁺/Mg²⁺-Lsg. gewaschen und für die restliche Zeit mit 15 µg/ml Gentamycin im Kulturmedium versehen. Nach 24, 48 oder 72 Stunden wird ausgewertet. Dabei ist es ratsam, die EGFP-Expression der Zellen erst unter dem Fluoreszenzmikroskop nachzuweisen. Anschließend werden die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen und mit 200 µl Trypsin/EDTA im Brutschrank für 15 min inkubiert. Dagegen können

Makrophagen vorsichtig mit einem Spatel in 500 μ l PBS von Napfboden abgekratzt werden. Die trypsinisierten Zellen lösen sich ab und werden in 400 μ l 1 \times PBS resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension in spezielle für das Durchflußzytometer geeignete Plastikröhrchen überführt. Diese werden auf Eis gestellt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl kann 5-10 min vor der eigentlichen Messung 2 μ l 7-Actinomycin C (7-AAD) zugesetzt werden. 7-AAD interkaliert mit doppelsträngiger DNA. Die Interkalation hemmt die durch RNA-Polymerase katalysierte, DNA-abhängige Synthese der RNA und ebenfalls die Neusynthese der DNA. 7-AAD kann aber nicht über intakte Zellmembranen diffundieren. Deshalb nehmen tote Zellen den Farbstoff auf und erscheinen im dritten Kanal des Durchflußzytometers. Das EGFP-Signal erscheint dagegen im zweiten Kanal.

4.5 *In vivo* und immunologische Methoden

Für alle *in vivo* und immunologischen Methoden werden ausschließlich pyrogenfreie (Endotoxinfreie) Lösungen, Puffer und Materialien verwendet. Selbst angesetzte Puffer/ Lösungen werden mit pyrogenfreiem Wasser, so genanntes Ampuwa-Wasser der Fa. Gibco angesetzt.

4.5.1 Infektion von Mäusen mit Listerien

Im Rahmen der Verwendung von *Listeria* als Vakzine-Träger, wurden BALB/c Mäuse und C57BL/6 Mäuse nur intravenös (*i.v.*) mit Listerien infiziert. Die sublethale Dosis bei einer *i.v.*-Applikation von wildtypischen Listerien beträgt 5×10^3 Bakterien/ BALB/c Maus, die LD₅₀ dagegen liegt bei 10^4 Bakterien/ C57BL/6 Maus [76]. Daher müssen die wildtypischen Bakterien bei dieser Applikationsart möglichst genau auf eine Konzentration von 5×10^4 Bakterien /ml in 0.9 % NaCl eingestellt werden. Dagegen werden die autolysierenden Listerien und die Deletionsstämme in einer Dosis von 5×10^8 Bakterien/ml in 0.9 % NaCl-Lösung eingestellt. Die Infektionsaliquots die nach Rezept (\rightarrow 4.2.7) pyrogenfrei hergestellt wurden und deren Ledendzellzahl schon 2 Tage vorher durch Ausplattieren bestimmt wurde, werden aufgetaut und mit geeigneten Verdünnungstufen in 0.9 % NaCl-Lösung auf die Infektionsdosis eingestellt. Anschließend werden langsam 100 μ l der verdünnten Bakteriensuspension mit einer 0,4 \times jeweilige 20 mm (27 G) Einmal-Injektionsspritze in eine seitliche Schwanzvene der fixierten Maus gegeben. Zuvor kann zur besseren Darstellung der Schwanzvenen die Maus kurzzeitig unter einer Wärmelampe gesetzt werden.

Die infizierten Tiere werden täglich beobachtet. Sollte ein Tier wider Erwarten ernsthaft erkranken und leiden, so wird es sofort artgerecht und schmerzlos getötet.

4.5.1.1 Präparation der Listerien aus Milz und Leber

Die Bakterienzahlen in den befallenen Organen Leber und Milz wird durch Ausplattieren bestimmt. Dabei dienen Bakterienzahlen zu verschiedenen Zeiten der Infektion als Parameter der murinen Listeriose. Mäuse werden in Gruppen zu je 5 Mäusen mit den jeweiligen Stämmen infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion werden die Tiere durch zervikale Dislokation oder durch Inhalation von CO₂ getötet. Die Organe werden steril entnommen und in 15-ml Greinerröhrchen mit jeweils 5 ml sterilem eiskaltem H₂O_{dest.} überführt. Das eiskalte Wasser

veranlasst, dass die Organe schon teilweise homogenisieren. Anschließend dekantiert man Organ und Wasser in einen sterilen Glashomogenisator, homogenisiert gründlich und dekantiert schließlich die Suspension zurück in das ursprüngliche 15-ml Greinerröhrchen. Zur vollständigen Aufschließung der Zellen werden die Zellsuspensionen jeweils für 10 sec. mit Ultraschall behandelt. Schließlich werden die Suspensionen in geeigneten Verdünnungsstufen auf BHI-Platten ausplattiert.

4.5.2 Mauszucht und Typisierung von TCR transgenen Mäusen

4.5.2.1 Mauszucht

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden im Raum B058 des Tierstalls des Biozentrums der Universität Würzburg in einem Luftstromschrank mit Hochleistungsschwebstofffilter von 0.3 μm gehalten. Die Zucht erfolgte im Verhältnis 2 Weibchen: 1 Männchen, die Jungtiere wurden im Alter von 4 Wochen von der Mutter getrennt.

4.5.2.1.1 OT-I und OT-II Mäuse

Züchtungspäarchen der transgenen OT-I Und OT-II Mäuse wurden freundlicherweise von Frau Prof. Schimpl aus dem Institut für Virologie und Immunologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Mäuse (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb (OT-I) und C57BL/6 Tg(TcraTcrb)425Cbn (OT-II)), die in ihrem jeweiligen T-Zell-Rezeptor transgen sind. T-Zellen exprimieren nun selektiv die vorarrangierten α - und β -Ketten des T-Zellrezeptors (TCR), der spezifisch ein Ovalbumin-Epitop auf MHC-Klasse-I (OT-I) oder MHC-Klasse-II (OT-II) erkennt. Die variablen Segmente der TCR-Ketten sind dabei für beide Stämme gleich ($V_{\alpha 2}$, $V_{\beta 5}$). Die Mäuse stammen von einem C57BL/6 Hintergrund (Haplotyp H2^b).

4.5.1.2 Schwanzblutentnahme und Typisierung

Unter der Typisierung versteht man eine Methode mit deren Hilfe genetisch manipulierte Mäuse (transgene Tiere, knock-out-, knock-in, konditionale knock-out-Tiere) hinsichtlich ihres Genotyps charakterisiert werden. Da es sich hier bei den transgenen Mäusen um eine Manipulationen von Komponenten des Immunsystems handelt, kann man sich die phänotypische Veränderungen an den Lymphozyten zunutze machen und diese durch Anfärben mit Fluorochromkonjugierten Antikörpern und nachfolgender Durchflußzytometrie von Blutlymphozyten charakterisieren.

Für die Blutabnahme wird die Maus unter einer Infrarotlampe erwärmt. Dies führt zur Weitung der Blutgefäße (Vasodilatation) und somit zur Förderung der Durchblutung. Durch einen Schnitt in die untere Schwanzvene wird der Maus einige Tropfen Blut entnommen und sofort mit ca. 20 μl Liquimin[®] N 25 000-Lösung (25000 I.E./5 ml, Roche) vermischt, um die Blutgerinnung zu verhindern. Anschließend wird der Ansatz in ein für das Durchflußcytometer geeignetes Plastikröhrchen überführt und auf 1 ml mit „Staining Buffer“ aufgefüllt. Die Zellsuspension wird bei 1200 rpm und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Anschließend werden die erhaltenen Zellen mit den Antikörpern anti- $V_{\alpha 2}$ -FITC, anti- $V_{\beta 5}$ -FITC und anti-CD8-PE (für die OT-I Typisierung) oder mit anti- $V_{\alpha 2}$ -FITC, anti- $V_{\beta 5}$ -FITC und anti-CD8-PE (für OT-II Typisierung) für eine Oberflächenfärbung für 30 min bei 4 °C angefärbt. Danach wird sofort 1 ml der hämolytischen „Gey´s Solution“

dazugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Die Erythrozyten werden dabei durch den hypotonischen Schock lysiert. Durch Zugabe des „Staining Buffers“ wird die Lysereaktion abgestoppt und die Zellsuspension erneut pelletiert. Das Pellet wird in 300 µl „Staining Buffer“ resuspendiert und anschließend durchflußzytometrisch ausgewertet. Anhand des prozentualen Anteils von transgenen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen unter allen Lymphozyten lässt sich feststellen, ob die Maus transgen ist (Abb.: 4.3).

Die verwendeten Medien:

- 10×Dulbecco´s PBS, pH 7.4 , (0.2 µm)
 - 2 g/L KCl
 - 2 g/L KH₂PO₄
 - 80 g/L NaCl
 - 11.4 g/L Na₂HPO₄ (wasserfrei), ad 1000 ml Ampuwa-Wasser

- „Staining Buffer“:
 - 10× Dulbecco´s PBS
 - 1 % inaktives FKS
 - 0.09 % Na-Azid Lösung
 - ad 1000 ml Ampuwa-Wasser

- Hämolytische „Gey´s Solution“:
 - 7 Volumenteile (Vt) Ampuwa-Wasser
 - 2 Vt Stock A
 - 0.5 Vt Stock B
 - 0.5 Vt Stock C

- Stock A der hämolytischen „Gey´s Solution“, (0.2 µm)
 - 35 g /L NH₄Cl
 - 1.85 g/L KCl
 - 1.5 g/L Na₂HPO₄ (× 12 H₂O)
 - 0.12 g/L KH₂PO₄
 - 5.0 g/L Glucose
 - ad 1000 ml Ampuwa-Wasser

- Stock B der hämolytischen „Gey´s Solution“, (0.2 µm)
 - 0.42 g MgCl₂ (× 6 H₂O)
 - 0.14 g MgSO₄ (× 7 H₂O)
 - 0.34 g CaCl₂
 - ad 100 ml Ampuwa-Wasser

- Stock C der hämolytischen „Gey´s Solution“, (0.2 µm)
 - 2.25 g NaHCO₃, ad 100 ml Ampuwa-Wasser

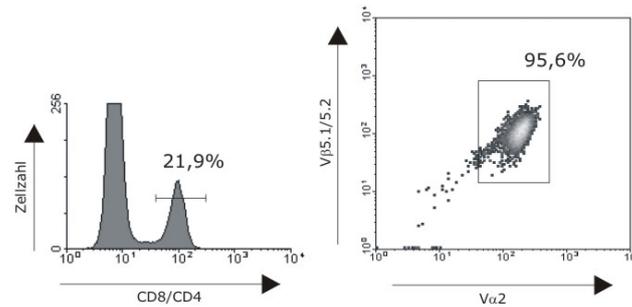


Abb. 4.3: Beispiel zur Quantifizierung von transgenen T-Zellen einer durchgeführten Durchflußzytometer-Analyse. Suspensionen aus Milzzellen werden mit spezifischen Antikörpern angefärbt und per Durchflußzytometrie analysiert. OT-I oder OT-II T-Zellen werden durch die monoklonalen Antikörper anti-CD8 oder anti-CD4, anti-V α 2 und anti-V β 5.1/5.2 identifiziert. Angegeben ist jeweils der Prozentsatz transgener CD8⁺/CD4⁺ T-Zellen.

4.5.3 Herstellung von Einzelzellsuspension aus Milzen

Spendermäuse werden durch zervikale Dislokation oder durch Inhalation von CO₂ getötet, die Milzen werden steril entnommen. Bei den Organentnahmen sollte darauf geachtet werden, das Fett zu entfernen, da dies bei der späteren Verarbeitung zu viele Zellen bindet. Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen, werden die Organe in einer mit BSS/BSA-Lösung-gefüllten Petrischale (Ø 10 cm) durch einen 70 μ m Zellsieb mit dem Stempel einer Injektionsspritze zerrieben. Die Zellsuspension wird nach 10-minütigen Stehen lassen auf Eis (eventuell vorhandene Gewebereste setzen sich ab) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes werden die Zellen anschließend einer Erythrozytenlyse unterzogen. Dafür wird das Pellet aufgeschlagen und in 5 ml hämolytische „Gey´s Solution“ resuspendiert und für 4 min bei RT inkubiert. Anschließend wird mit der BSS/BSA-Lösung auf 50 ml aufgefüllt, nochmals abzentrifugiert und der Überstand abgezogen. Schließlich wird das Pellet in einem definierten Volumen an BSS/BSA-Lösung resuspendiert und die Lebendzellzahl mittels Trypanblaufärbung in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt.

Die Einzelzellsuspensionen der Milzen mit definierten Zellzahlen können nun in der Durchflußzytometrie-Analyse, in ELISA- oder ELIPOT-Assays oder im adoptiven Transfer eingesetzt werden. Für den adoptiven Transfer werden die Einzelzellsuspensionen nur mit BSS-Lösung ohne Zugabe von BSA hergestellt. Für ELISA- oder ELIPOT-Assays werden die Einzelzellsuspensionen in dem Kulturmedium RPMI + „Goodies“ verdünnt.

Lösungen für die Herstellung von Einzelsuspensionen:

- 10×BSS (“balanced salt solution”) Stock 1
 - 10 g/L D-Glukose
 - 0.6 g/L KH₂PO₄
 - 1.83 g/L Na₂HPO₄ (wasserfrei)
 - 0.1 g/L Phenolrot
 - in Ampuwa-Wasser, pH 7.4, (0,2 μ m)

- 10×BSS Stock 2
 - 1.86 g/L CaCl₂ (× 2 H₂O)
 - 4 g/L KCl
 - 80 g/L NaCl
 - 2 g/L MgCl₂ (× 6 H₂O)
 - 2 g/l MgSO₄ (× 7 H₂O)
 - in Ampuwa-Wasser, (0.2 µm)

- BSS/BSA
 - 1 Vt 10×BSS1
 - 1 Vt 10×BSS2
 - 8 Vt Ampuwa-Wasser
 - 0.01 Vt BSA-Stocklösung

- BSA-Stocklösung
 - 10 % (w/v) BSA in Ampuwa-Wasser, (0.2µm)

- RPMI + „Goodies“
 - 10 % (v/v) FKS
 - 0,025 % (v/v) β-Mercaptoethanol
 - 0,05 % (v/v) L-Glutamin
 - 1 mM Nartiumpyruvat
 - je 200 U/ml Penicillin/ Streptomycin
 - 1x MEM-nicht-essentielle Aminosäuren
 - in RPMI 1640, (0.2 µm)

4.5.4 Adoptives-Transfer-Experiment

Für den Transfer von TCR-transgenen T-Lymphozyten aus den OT-I und OT-II Mäusen in nicht transgene Empfängertiere werden zunächst Einzelzellsuspensionen von Milzen der Spendertiere hergestellt (→ 4.5.3). Vorher wurden per Durchflusszytometrie-Analyse die Spendertiere auf Anteil der TCR-transgenen T-Zellen typisiert (→ 4.5.1.2). Die Konzentration der Einzelsuspensionen wird so eingestellt, dass die zu transferierende Zellzahl von 1×10^7 in 200 µl Endotoxin-freien 1×PBS in die Schwanzvene der Empfängertiere injiziert werden kann. Dafür werden in 3-5 Mäuse pro Gruppe die Milzsuspensionen transferiert. Am darauf folgenden Tag werden denselben Spendermäuse *Listerien*, welche OVA-Vakzine tragen, appliziert. Drei Tage nach der bakteriellen Infektion erfolgt, die Entnahme der Milzen, die Aufarbeitung von Einzelzellsuspensionen und die durchflußzytometrische Analyse dieser Einzelzellsuspensionen um die Häufigkeit der transferierten Zellen zu bestimmen (Abb.: 4.4).

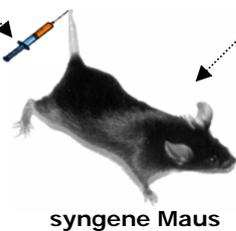
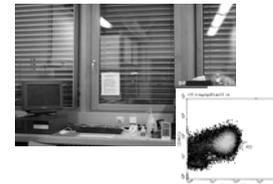
Tag 1: Präparation der Milzzellen aus den transgenen Tieren und Transfer in syngene Mäuse



Tag 2: Infektion mit listeriellen Vakzine-Trägern



Tag 4: Präparation der Milzzellen und durchflußzytometrische Analyse



Durchflußzytometer

Abb. 4.4: Schematische Skizze der Durchführung des adoptiven-Transfer-Experimentes

4.5.5 Färbung der Milzzellen

Um die Häufigkeit von transferierten transgenen Zellen in Spendermäuse nachzuweisen, werden Einzelzellsuspensionen der Milzen hergestellt. Anschließend werden 10^6 Milzzellen pro Probe in speziell für das Durchflußcytometer geeignete Röhrchen abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand mit einer Vakuumpumpe abgezogen, so dass ein Rest von 20 μ l „Staining Buffer“ und Zellpellet verbleibt. Das Pellet wird in diesem Volumen mit „Staining Buffer“ resuspendiert. Je nachdem, welche transgenen Zellen (OT-I oder OT-II T-Zellen) in die Spendermäuse transferiert worden sind, müssen nun verschiedene Antikörper zur Färbung von bestimmten Oberflächenantigenen dieser transgenen Zellen verwendet werden:

Anfärbung von OT-I Zellen

30 μ l einer 1:40 verdünnten Lösung des PE-markierten MHC Tetramers H-2K^b:SIINFEKL werden zu den resuspendierten Milzzellen pipettiert und das ganze für 60 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird mit „Staining Buffer“ gewaschen und bei 1200 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das zweite Antikörpergemisch setzte sich nun zusammen aus dem FITC-markierten anti-Maus CD8a (Ly-2) und dem PE-CY5-markiertem Ratte anti-Maus CD44 (Pgp-1, Ly-24) Antikörper, die jeweils 1:400 in „Staining Buffer“ verdünnt wurden. Nach einer 30 minütigen Inkubation werden die Probenröhrchen mit „Staining Buffer“ aufgefüllt, für 5 min mit 1200 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wird anschließend in 400 μ l „Staining Buffer“ resuspendiert.

Alternativ wird die Häufigkeit an OT-I Zellen durch die Anfärbung mit folgenden Antikörpern bestimmt: FITC-markiertem Anti-Maus V α 2 TCR (B20.1) (1:600 in Staining-Puffer), PE-markiertem Anti-Maus V β 5.1, 5.2 TCR (MR 9-4) und Cy-chrome-markiertem Anti-Maus CD(5.3-6.7) (jeweils 1:200 in Staining-Puffer). Nach 30 min Inkubation im Dunkeln wird mit „Staining Buffer“ aufgefüllt und für 5 min mit 1200 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und das Pellet in 400 μ l „Staining Buffer“ resuspendiert.

Anfärbung von OT-II Zellen

Für die Bestimmung der Häufigkeit von OT-II T-Zellen werden 30 µl einer Antikörpermischung aus FITC-markiertem Anti-Maus V α 2 TCR (B20.1) (1:600 in Staining-Puffer), PE-markiertem Anti-Maus V β 5.1, 5.2 TCR (MR 9-4) und Cy-chrome-markiertem Anti-Maus CD4 (L3T4) (jeweils 1:200 in Staining-Puffer) Antikörper zu den resuspendierten Milzzellen pipettiert und das ganze für 30 min auf Eis, im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wird mit „Staining Buffer“ aufgefüllt, für 5 min mit 1200 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und anschließend das Pellet in 400 µl „Staining Buffer“ resuspendiert

Die Analyse der gefärbten Milzzellen erfolgt am Durchflußcytometer (Epics XL flow cytometer, Beckman Coulter) und die Verarbeitung der Daten erfolgt mit dem WinMDI 2.8-Programm.

4.5.6 Immunisierung von Mäusen

Für die Immunisierung der Mäuse mit den jeweiligen Vakzine-Trägerstämmen werden 5 Mäuse pro Gruppe mit 5×10^7 Bakterien dreimalig in 2-wöchigen Intervallen infiziert. Die Kontrollgruppe wird mit 0,9 % NaCl-Lösung infiziert. Am Tag 7 nach der letzten Infektion werden den Mäusen Blut zur Gewinnung von Antiseren sowie Milzen, für die Isolierung von T-Lymphozyten, für zytometrische Auswertungen und für ELISA- oder ELISPOT-Assays entnommen.

4.5.6.1 Blutentnahme der Maus

Für eine maximale Gewinnung von Antiserum aus einer Maus dient die Blutentnahme aus dem Herzen. Dafür wird die Maus durch CO₂-Inhalation und nicht durch zervikale Dislokation getötet, damit die Gefäße im Brustraum nicht vorzeitig zerreißen. Anschließend wird die Bauchhöhle entlang der Linea alba geöffnet, so dass danach die Brusthöhle geöffnet werden kann. Das Zwerchfell wird zerschnitten und die Rippen werden an der linken Seite durchgeschnitten und hochgeklappt, so dass nun das Herz frei zugänglich ist. Anschließend sticht man mit einer langen Kanüle (23 G, Gr.16) auf einer Tuberkulinspritze vorsichtig in den rechten Vorhof und lässt das Blut ganz langsam durch vorsichtiges Ziehen des Stempels in die Spritze laufen. Das Blut wird danach in einen Mikrocontainer, der auf Eis steht, überführt. In diesem Mikrocontainer befindet sich ein spezielles Harz, um nach fünfminütiger Zentrifugation das Serum vom Blutkuchen besser abtrennen zu können. Das Serum liegt nach der Zentrifugation über dem Harz und kann somit abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden.

Werden nur kleinere Mengen an Blut benötigt, kann die Entnahme des Blutes aus der Schwanzvene erfolgen.

4.5.6.2 Isolierung von T-Lymphozyten

Um Lymphozyten aus einer Zellpopulation zu isolieren, wird ein mechanisches Verfahren angewandt. Verwendet werden paramagnetische Partikel, die mit Antikörpern gegen charakteristische Oberflächenmoleküle beschichtet sind. Diese antikörperbeschichteten Partikel werden mit Zellen einer heterogenen Lymphozytenpopulation vermischt, die getrennt werden

sollen. Anschließend werden die Ansätze mit einem zweiten Material vermischt, so dass die paramagnetischen Komplexe festgehalten werden, so bald die Ansätze einem starken Magnetfeld ausgesetzt werden. Die an den Antikörpern gebundenen Zellen bleiben hängen, während nicht gebundene Zellen ausgewaschen werden. Die gebundenen Zellen werden aufgrund der Expression des spezifischen Oberflächenmoleküls positiv selektiert, die ungebundenen Zellen aufgrund der fehlenden Expression dagegen negativ. Die Isolierung der Lymphozyten aus der heterogenen Milzpopulation wurde mit Hilfe des „Mouse T Lymphocyte Enrichment“ Sets durch negative Selektion nach Angaben des BD Herstellerprotokolls isoliert.

4.5.6.3 Enzym Assays

4.5.6.3.1 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA ist eine Abkürzung für „enzyme linked immuno sorbent assay“. Prinzipiell kann mit Hilfe des ELISAs in einer enzymvermittelten Farbreaktion die Wechselwirkung von Antigen und Antikörper nachgewiesen werden. Es können dabei verschiedenste biomolekulare Substanzen (z.B. Proteine, Viren) oder auch niedermolekulare Verbindungen (z. B. Hormone, Toxine, Pestizide) in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin, etc.) nachgewiesen werden. Hier werden ELISAs zur Ermittlung von IFN- γ und IgG Antikörper in den immunisierten Mäusen durchgeführt.

IFN- γ ELISA

Um eine adaptive Immunantwort zu detektieren, kann das Interferon- γ (IFN- γ) als Marker dienen. Dieses Interferon wird von T_H1- und zytotoxischen T-Zellen, ebenso wie von NK-Zellen produziert. Nachdem Einzelzellsuspensionen aus den Milzen hergestellt wurden, werden diese zur Einstellung einer bestimmten Zellzahl in einem definiertem Volumen an RPMI + „Goodies“ aufgenommen. Anschließend werden je 100 μ l in Näpfe einer 96-Napf-Platte mit vorgelegten Stimulantien pipettiert. Nach einer 24-stündigen Stimulation der Milzzellen werden die 96-Napf-Platten eingefroren und kurz vor der Durchführung des ELISAs wieder aufgetaut. Die Bestimmung der IFN- γ Konzentration in den Zellkulturüberständen erfolgt durch das „BD OptEIA™ Mouse IFN- γ Set“ nach Herstellerprotokoll: Einen Tag vor der Durchführung des Testes werden Maxisorb-Platten mit 100 μ l „Capture Antibody“ in „Coating buffer“ beschichtet und bei 4 °C inkubiert. 24 Stunden später werden die Platten mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit „Assay Diluent“ für eine Stunde inkubiert. Währenddessen werden Verdünnungsreihen aus dem im Set befindlichen Standard hergestellt. Die Verdünnungsreihen des Standards sowie die Probenansätze werden nun zu je 100 μ l auf die Platten pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 Waschschritten erfolgt die Zugabe von 100 μ l „Working-detector“ Lösung, bestehend aus einem biotinyliertem „Detection Antibody“ und einem Avidin-Peroxidase-Konjugat. Es wird 1 h lang inkubiert. Anschließend muss gründlich gewaschen werden, so dass schließlich die Zugabe von jeweils 100 μ l einer frischen Substratlösung aus dem Set „TMB Substrate Reagent Set“ zu den einzelnen Näpfen erfolgen kann. Es erfolgt eine 30 min Inkubation im Dunkeln, wobei eine blaue Farbreaktion in den Näpfen entsteht, die mit 50 μ l 2 N H₂SO₄ gestoppt wird. Die Auswertung erfolgt durch die Bestimmung der Subtraktion der erhaltenen Werte bei OD_{450nm} und OD_{570nm}.

Anschließend werden die Zytokin-Konzentrationen der Proben mit Hilfe der doppelt-logarithmisch aufgetragenen Standardkurve kalkuliert.

OVA-ELISA

Um nachzuweisen, dass IgG Antikörper im Serum immunisierter Mäuse gegen Ovalbumin vorliegen, kann ein ELISA mit dem Stimulanz Ovalbumin durchgeführt werden. Dafür werden am Vortag des ELISAs Maxisorb-Platten mit 2 mg/ml Ovalbumin in „Coating Buffer“ beschichtet und bei 4 °C für 24 h inkubiert. Am nächsten Tag werden die Näpfe der Platten mit Waschpuffer gewaschen und mit „Assay Diluent“ für 1 h bei RT geblockt. Währenddessen wird eine Verdünnungsreihe des Standards aus einem definiertem Kontrollserum hergestellt. Auch die einzelnen Probeseren werden in 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 Schritten im „Assay Diluent“ verdünnt. Diese Ansätze werden anschließend in die Näpfe überführt und für 2 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation werden die Platten gewaschen, mit dem Konjugant bestehend aus einer 1:20000 Verdünnung des Ziege anti-Maus IgG Antikörpers (anti-Maus IgG, anti-Maus IgG₁ oder IgG_{2a}) in „Assay Diluent“ bei RT für 1 h inkubiert. Anschließend wird gründlich gewaschen, so dass die Zugabe von 100 µl des frisch angesetzten Substrates TMB für 2 h im Dunkeln bei RT erfolgen kann. Die Reaktion wird mit 50 µl 2 N H₂SO₄-Lösung gestoppt. Die Auswertung erfolgt durch die Bestimmung der Subtraktion der erhaltenen Werte bei OD_{450nm} und OD_{570nm}.

Verwendete Puffer:

- „Coating Buffer“
0.1 M Carbonat pH 9.5
- Waschpuffer
1×PBS + 0,05 % Tween 20
- „Assay Diluent“
1×PBS + 10 % FCS

4.5.6.3.2 Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISPOT)

Der „Enzyme Linked Immuno Spot Assay“ (ELISPOT) bietet die Möglichkeit, nach einer Stimulation die Immunantwort spezifischer Lymphozyten auf Einzelzellebene zu quantifizieren. Dafür wird eine Mikrotiterplatte mit dem monoklonalen Antikörper gegen das zu detektierende Zytokin (z. B. IFN- γ) beschichtet. Auf der Platte erfolgt dann direkt die Stimulation der Effektor-T-Zellen der zu testenden Proben. Als Stimulantien dienen beispielsweise dendritische Zellen, Peptidepitope oder sogar ganze Proteine. Erfolgt die Ausschüttung des Zytokins als Reaktion auf die Stimulation von den Lymphozyten, wird es von den Antikörpern am Ort der Entstehung direkt gebunden. Das Zytokin wird danach mit einem zweiten enzymgekoppelten Antikörper (z. B. Streptavidin-Peroxidase-gekoppelter Antikörper) detektiert. Die Enzymreaktion (Farbreaktion) ermöglicht nun, das Stellen auf der Mikrotiterplatte ("Spots") sichtbar werden, an denen sich aktivierte Lymphozyten befanden. Anschließend werden die erhaltenen Spots mit einem Stereomikroskop (Zeiss) ausgezählt. Die Anzahl der Spots kann als Maß für die Reaktivität des Immunsystems auf einen bestimmten Stimulus interpretiert werden und ermöglicht so eine standardisierte Beurteilung

der Immunreaktion im Versuchsverlauf. Pro Spender werden drei Näpfe als Positivprobe mit Stimulanz und als Negativkontrolle ohne Stimulanz (dreifach Ansatz) verwendet.

- eine 96-Napf-Nitrozellulose-Platte wird mit 100 μ l einer 5 μ g/ml Antikörperlösung des monoklonalen anti-Maus IFN- γ (R4-6A2, Pharmingen; Verdünnung in „Coating Buffer“) pro Napf beschichtet und übernacht bei 4 $^{\circ}$ C inkubiert
- am nächsten Morgen wird der „Coating Buffer“ abgesaugt und die Näpfe werden mit 1 \times PBS aufgefüllt und für 1 h bei RT inkubiert
- Platte wird zweimal mit 1 \times PBS gewaschen
- anschließend wird für 2h mit dem Blocking-Puffer im 37 $^{\circ}$ C Zell-Brutschrank inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen
- Platte wird einmal mit 1 \times PBS gewaschen und je 100 μ l der Stimulantien und Milzsuspensionen werden dazugegeben und im 37 $^{\circ}$ C Zell-Brutschrank inkubiert
- 21-24 h später werden die Näpfe zehnmal mit 1 \times PBS und zehnmal mit Waschpuffer gewaschen
- anschließend erfolgt eine 2 h Inkubation im 37 $^{\circ}$ C Zell-Brutschrank mit dem biotinylierten IFN- γ Antikörper XMG 1.2 (Pharmingen) in einer Konzentration von 0.25 μ g/ml in Waschpuffer, der in 100 μ l zu jedem Napf dazu pipettiert wird
- danach wird die Platte zehnmal mit Waschpuffer gewaschen
- eine Streptavidin-alkalische Phosphatase (Pharmingen) wird in einer 1:20000 Verdünnung in Konjugant-Puffer zu je 100 μ l zu den Näpfen pipettiert bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert
- 1h später wird die Platte fünfmal gewaschen, der Substratpuffer BCIP-NBT (Sigma) wird zu je 50 μ l/Napf aufgetragen und abgedunkelt 15 min im Brutschrank stehen gelassen
- Die Platte wird ausführlich mit H₂O_{dest.} gewaschen und zum trocknen bei RT stehen gelassen

Verwendete Puffer:

- „Coating Buffer“, pH 9.6
0.53 g Na₂CO₃
0.42 g NaHCO₃
ad 100 ml Ampuwa-Wasser
- Blocking-Puffer
1 \times PBS + 1 % BSA
- Konjugant-Puffer
1 \times PBS + 0,05 % Tween20 + 1 % BSA
- Waschpuffer
1 \times PBS + 0,05 % Tween20

4.6 Spezielle Methoden

4.6.1 Immunofluoreszenzanalyse

Zur Anfärbung von intrazellulären Bakterien eignet sich die Methode der Immunfluoreszenzanalyse. Eukaryotische Zellen werden am Vortag der Infektion auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag entsprechend der beschriebenen Methode (→ 4.4.2.1) infiziert, gewaschen und bis zur Immunofluoreszenzanalyse im Gentamicin-haltigem Kulturmedium inkubiert. Am Tag der Analyse werden die infizierten Zellen einmal mit 1×PBS und anschließend mit PHEM-Lösung gewaschen. Darauf folgt eine 1-minütige Inkubation der Zellen in PHEM/Triton-Lösung, welche zum Permeabilisieren der Zellen führt. Zur Fixierung der Zellen werden die Deckgläschen in eine Glasschale mit eiskaltem Aceton überführt und darin für genau 3 min inkubiert. Anschließend werden die Präparate luftgetrocknet. Nach dem Trocknen legt man die Präparate für eine Stunde mit der Zellseite nach unten jeweils auf einen Tropfen der ersten Antikörperlösung. Anschließend werden die Präparate in einem Becherglas mit 1×PBS gewaschen, in dem die Deckgläschen nacheinander vorsichtig darin geschwenkt werden. Das überschüssige 1×PBS wird vorsichtig mit einem Streifen Whatman-Papier entfernt, die Präparate werden jeweils nun auf einen Tropfen des zweiten fluoreszenzmarkiertem Antikörpers gelegt und wieder für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift kann eine zusätzliche Färbung zur Visualisierung des Aktingerüsts oder des eukaryotischen Zellkernes angeschlossen werden. Nach den Färbeschritten werden die Präparate noch mal ausgiebig gewaschen und schließlich in 3 µl Vectashield-Medium auf einem Objektträger eingebettet. Nach dem Entfernen von überschüssigem Vectashield-Mediums werden die Präparate mit Nagellack versiegelt. Die Präparate sollten sofort mikroskopiert und fotografiert werden, da nach ca. 1 bis 2 Tagen das Aktin-Netzwerk der Zellen degradiert.

- PHEM-Lösung, pH 6,9
 - 60 mM Pipes
 - 23 mM Hepes
 - 10 mM EGTA
 - 1 mM MgCl₂ (× 6 H₂O)
- PHEM/Triton
 - PHEM-Lösung + 0.5 % Triton-X-100
- Vectashield-Medium (Vector Laboratories)

4.6.2 MTT-Test

Die Anzahl an vitalen Wirtszellen soll nach Infektion mit verschiedenen *Lm* Stämmen mit Hilfe des MTT-Test bestimmt werden. Es handelt sich um einen kolorimetrischen nicht-radioaktiven Test, der auf der Reduktion des gelben 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) (Sigma M2128) zu unlöslichen Formazankristallen (blau/lila) durch zelluläre Dehydrogenasen beruht. Die Absorption des entstandenen Formazans wird spektrophotometrisch bei einer

Wellenlänge von 405-570 nm bestimmt, wo MTT nicht absorbiert. Da Dehydrogenasen nur in lebenden Zellen (Mitochondrien) aktiv sind, dient die Umwandlung von MTT als Maß für die Viabilität der Zellen. Dabei dienen nicht infizierte Zellen als Referenz und werden als 100 % Vital angesehen:

- infizierte Zellen werden 24, 48, 72 h nach Infektion mit 0.4 ml MTT-Lösung (2,5 mg/ml in RPMI 1640 ohne Phenolrot) für 4h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert
- nach dem Abzug der MTT-Lösung wird die Farbreaktion durch Zugabe von je 1 ml 10 % HCL in 2-Propanol gestoppt
- die Proben werden bei einer Wellenlänge von 405-570 nm gemessen.

4.7 Statistik

Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte (zweiseitiger stud. T-Test) wurden mit dem Programm Microsoft® Excel 2003 berechnet.

5.1 Anwendungen verschiedener Vakzinierungsstrategien unter der Verwendung von virulenzattenuierten *Listeria monocytogenes* Stämmen

Ziel dieser Arbeit war es, neuartige Vakzinierungsstrategien unter der Verwendung des Gram-positiven Bakteriums *Listeria monocytogenes* (*Lm*) als Überträger für heterologe Proteinantigene in die Maus zu untersuchen.

Eine häufig angewandte Strategie, heterologe Proteinantigene durch Listerien in den Wirt zu transportieren ist, dass *Lm* dieses Protein selbst exprimiert und über eines seiner eigenen Sekretionssysteme exportiert [105]. Eine Alternative zu dieser sogenannten „Protein-Delivery“-Strategie ist die Freisetzung von Plasmid-DNA in den Wirt, wobei diese DNA das gewünschte heterologe Protein kodiert („DNA-Delivery“) [286, 317]. Diese Strategie resultiert schließlich in der Expression des Antigens durch den infizierten Wirt. In vorangegangenen Arbeiten wurde eine effiziente Freisetzung von Plasmid-DNA unter der Verwendung von autolysierenden, virulenzattenuierten *Lm* Stämmen mit nachfolgender Expression und Antigenpräsentation durch APC demonstriert [67, 235]. Die dritte Strategie zur Übertragung von heterologen Proteinantigenen durch *Listeria* ist die „RNA-Delivery“-Strategie, die erstmals in dieser Arbeitsgruppe entwickelt wurde. Dazu werden *Lm* Stämme verwendet, die funktionelle messenger RNA (mRNA) transkribieren und schließlich durch Autolysis in infizierten Wirtszellen freisetzen, so dass diese die mRNA translatieren. Diese „RNA-Delivery“-Strategie zeigte im Vergleich zum „DNA-Delivery“ eine schnellere und auch bessere Übertragung des gewünschten heterologen Proteins (EGFP) in antigenpräsentierende Zellen [266].

Deshalb bestand die erste Aufgabe darin, das Gen für das Hühnereiweiß Ovalbumin (OVA) als Modellantigen in verschiedene, für diese drei Strategien geeignete Expressionsplasmide zu klonieren und diese *in vitro* zu charakterisieren. Anschließend sollten *in vivo* Experimente zur Klärung der Eignung der virulenzattenuierten Mutante *Lm* $\Delta trpS$ als Überträger von Ovalbumin in Form von Proteinen, als plasmidkodierte DNA oder als funktionelle mRNA durchgeführt werden. Dabei sollte festgestellt werden, ob die Mutante eine effiziente MHC-Klasse-I- oder II-restringierte Präsentation des Ovalbumins und damit eine Erkennung, Aktivierung und Proliferation von spezifischen CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen induziert. Gleichzeitig sollten die drei Strategien bezüglich ihrer Effizienz miteinander verglichen werden. Schließlich sollte nach erfolgreichem Nachweis dieser primären Aktivierung von OVA-spezifischen T-Lymphozyten auch untersucht werden, ob eine entsprechend generierte adaptive Immunität, in die OVA-spezifische T-Gedächtniszellen involviert sind, nach Immunisieren mit den jeweiligen Trägerstämmen entsteht.

Als zweite Aufgabe sollte ein immunogenes Protein des murinen Zytomegalievirus (mCMV) in die Expressionsplasmide der drei Vakzinierungsstrategien kloniert werden. Nachfolgend sollte in *in vivo* Experimenten durch den Einsatz des mCMV-Proteins als weiteres Modellantigen nachgewiesen werden, ob $\Delta trpS$ -Mutanten auch fähig sind, durch dessen Freisetzung als Protein, als plasmidkodierte DNA oder mRNA, eine adaptive Immunität mit nachfolgendem Schutz gegen das murine Zytomegalievirus zu etablieren.

5.1.1 Ovalbumin als Modellantigen

5.1.1.1 Konstruktion der Ovalbumin-Expressionsplasmide für die drei Vakzinierungsstrategien

Das erste Ziel dieser Arbeit war, OVA-Expressionsplasmide für die drei verschiedenen „Delivery“-Strategien zu konstruieren. Ovalbumin ist ein Glykoprotein, das ein Molekulargewicht von 45 kD besitzt. Wird nun Ovalbumin als lösliches Antigen in den Wirt injiziert, so kann dieses Protein auch durch sein internes Signalpeptid in das extrazelluläre Milieu des Wirtes gelangen [295]. Diese extrazellulären Proteine werden nach Aufnahme von APC über den MHC-Klasse-II-Weg den CD4 T-Lymphozyten präsentiert. Dagegen ist die Präsentation solcher extrazellulären Proteine im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen nur über Kreuzpräsentationsereignisse möglich [20]. Ovalbumin ohne Signalsequenz verbleibt in der Wirtszelle und löst im Gegensatz zum nativen OVA sehr gut eine Aktivierung von spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus [259]. Außerdem wird dieses zellassoziierte Ovalbumin viel besser kreuzpräsentiert und hat damit einen viel besseren Zugang zu „cross priming“-Prozessen. [185, 276]. Da in dieser Arbeit das Hauptinteresse auf der Aktivierung einer zellulären Immunantwort mit CD8 T-Lymphozyten liegt, wurde die Ovalbuminsequenz ohne die natürliche interne Signalsequenz (aa 19-144) in die Expressionskassetten kloniert. Die eigentliche Ovalbuminsequenz bestand schließlich nur noch aus den aa 145-386.

Als Ausgangsvektor für die Klonierungen wurde das Plasmid pCI-OVA, das das gesamte Ovalbumin kodiert, herangezogen. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von J. Fensterle aus der Medizinischen Strahlenkunde in Würzburg zur Verfügung gestellt. Die OVA-Expressionskassette für die „DNA-Delivery“-Strategie (Abb.: 5.1, A) wurde mit rekombinanten PCR-Techniken (→ 4.1.1.6) folgendermaßen hergestellt.

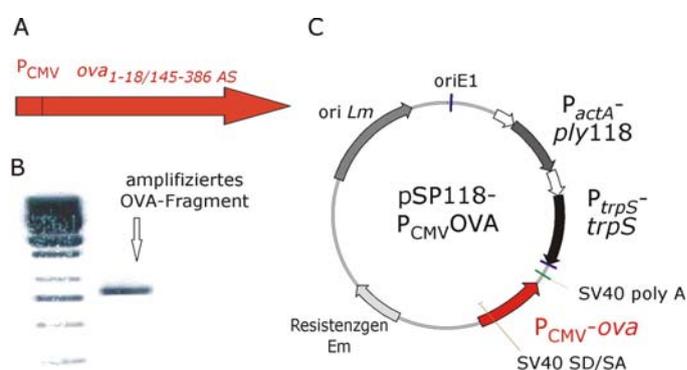


Abb. 5.1: (A, C) Schematische Darstellung der OVA-Expressionskassette für das „DNA-Delivery“ und das dazugehörige Expressionsplasmid. (B) Amplifikation des 764 bp großen, OVA-Fragmentes mittels rekombinanter PCR. ori *Lm*, Replikationsursprung für *Listeria*; oriE1, Replikationsursprung für *E. coli*; trpS, essentielles Gen von *Lm* kodiert unter Kontrolle des eigenen Promotors; P_{actA}-ply118, Autolysiskassette; Em, Resistenzgen.

In der ersten PCR wurde ein 37 bp Fragment mit den beiden Oligonukleotiden Ova2 (F) und Ova (b) kodierend für OVA-aa 1-19 und ein 727 bp Fragment mit den beiden Primern Ova (a) und Ova

(R) kodierend für OVA-aa 145-386 aus dem Ausgangsplasmid pCI-OVA amplifiziert. Für die anschließende Fragmentfusion wurden beide Fragmente in einer zweiten PCR-Reaktion homolog rekombiniert. Darauf wurden in einer dritten PCR-Reaktion das 764 bp große Fusionsfragment mit den beiden Primern Ova2 (F) und Ova (R) vervielfältigt. Das Fragment (Abb.: 5.1, B) wurde anschließend über eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle in das Plasmid pSP118- P_{CMV} kloniert. Diese Klonierung ergab das „DNA-Delivery“-Expressionsplasmid pSP118- P_{CMV} OVA (Abb.: 5.1, C)

Für die „RNA-Delivery“-Strategie wurden zwei verschiedene Plasmide, pCSA1 und pCSB-OVA in Kooperationsarbeit von C. Schoen konstruiert (Abb.: 5.2, B). Plasmid pCSA1 kodiert neben der Lysiskassette P_{actA} -ply118 und dem Gen *trpS* das Gen für die T7-Polymerase unter der Kontrolle von P_{actA} . Plasmid pCSB-OVA beinhaltet die eigentliche Ovalbumin-RNA-Expressionskassette, welches sich aus dem T7-Promotor, einer viralen internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES), dem Ovalbumingen (kodiert für die aa 145-386) und der T7-Terminatorsequenz zusammensetzt (Abb.: 5.2, A). Das IRES-Element dient zur 5' Cap-unabhängigen Translation des Ovalbumins.

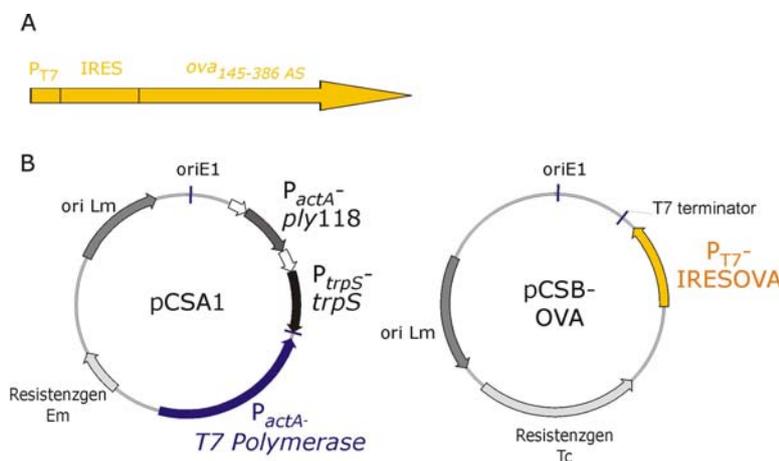


Abb. 5.2: Die schematisch dargestellte OVA-Expressionskassette für die „RNA-Delivery“-Strategie (A) und die zwei dazu gehörigen Plasmide (B). Plasmid pCSA1 kodiert die Lysiskassette P_{actA} -ply118 und die T7-RNA-Polymerasetranskriptionskassette (farbig). Plasmid pCSB-OVA trägt die OVA-Expressionskassette (farbig), welche unter der Kontrolle des T7-Promotors transkribiert wird. *ori* Lm, Replikationsursprung für *Listeria*;

*ori*E1, Replikationsursprung für *E. coli*; *trpS*, essentielles Gen von *Lm* kodiert unter Kontrolle des eigenen Promotors; P_{actA} -ply118, Autolysiskassette; Tc und Em, Resistenzgene.

Im dritten Expressionsplasmid pSPO- PS_{actA} OVA für die „Protein-Delivery“-Strategie (Abb.: 5.3, C1) wurde das verkürzte Ovalbumin (AS 145-386) unter der Kontrolle des listeriellen *actA*-Promotors kloniert und mit der Signalsequenz von *actA* fusioniert, so dass die Bakterien Ovalbumin exprimieren und auch exportieren können. Die Ovalbumin Expressionskassette PS_{actA} -ova (Abb.: 5.3, A) wurde durch den *PstI*- und *SacI*-Verdau des Plasmides pUC18- PS_{actA} OVA erhalten und über die Restriktionsschnittstellen *PstI* und *SacI* in das Expressionsplasmid pSPO kloniert (in Kooperationsarbeit mit C. Schoen).

Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass eine effiziente Freisetzung von Plasmid-DNA und mRNA erst durch die Autolyse der Trägerstämme im Zytoplasma der Wirtszellen ermöglicht wird [67, 235, 266]. Zur intrazytoplasmatischen Freisetzung der DNA und mRNA aus den Bakterienzellen enthalten die Plasmide pSP118- P_{CMV} OVA und pCSA1 eine Lysiskassette, welche aus dem Endolysingen *ply118* des *Listeria*-spezifischen Bakteriophagen A118 unter der Kontrolle des intrazellulär aktiven listeriellen Promotors P_{actA} besteht (Abb.: 5.1, C und 5.2, B). Nach orogastrischer Applikation der autolysierenden *Lm* Stämme wurde eine deutliche Reduktion der Bakterienanzahl in Leber und Milz von BALB/c Mäusen nachgewiesen [235].

Um eine vergleichende Studie zwischen den drei „Delivery“-Strategien durchführen zu können, mussten *Lm* Stämme verwendet werden, die eine vergleichbare Virulenzattenuation aufweisen. Deshalb wurde das Expressionsplasmid pSP118-PS_{actA}OVA (Abb.: 5.3, C2), das auch die Lysiskassette P_{actA}-ply118 enthält, für die „Protein-Delivery“-Strategie entwickelt, obwohl theoretisch keine zusätzliche Autolysis für den Export bakterieller Proteine über die Zellwand benötigt wird.

Für dieses Plasmid musste erst das Ausgangsplasmid pSP118 konstruiert werden, welches die Autolysiskassette P_{actA}-ply118 enthält. Aus dem Plasmid pSPO (S. Pilgrim), wurde über die Restriktionschnittstelle *Sa*I die 1439 bp große Expressionskassette für das Gen *trpS* herausgeschnitten, und anschließend wurde diese in das ebenfalls mit *Sa*I-verdaute Plasmid pUNK-ply118 (S. Pilgrim), welches die Lysiskassette P_{actA}-ply118 schon enthält, ligiert. Em-positive *E. coli* Klone, welche das Plasmid pSP118 enthalten, wurden per PCR durch die Amplifikation eines 1853 bp großen Fragmentes mit den Primern ply118up1 und oriE1checkfor überprüft.

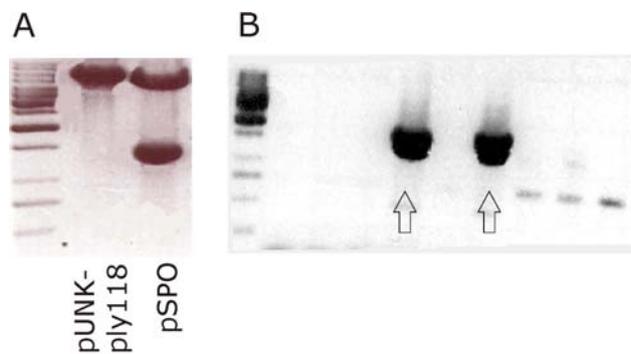


Abb. 5.4: (A) Verdau der Plasmide pUNK-ply118 und pSPO mit *Sa*I. In dem verdauten pSPO wird die 1439 bp große *trpS*-Expressionskassette nachgewiesen. (B) Zwei positive Klone nach Überprüfung der erhaltenen Klone pSP118 per PCR. Pfeile kennzeichnen jeweils das amplifizierte 1853 bp große Produkt mit den Primerpaaren ply118up1 und oriE1checkfor.

Nach Konstruktion des Plasmides pSP118 wurde dieses über den Doppelverdau mit *Pst*I und *Sac*I aufgeschnitten und mit der *Pst*I/*Sac*I-verdauten Ovalbuminkassette PS_{actA}-ova aus dem Plasmid pSP0-PS_{actA}OVA ligiert, resultierend im Plasmid pSP118-PS_{actA}OVA (Abb.: 5.3, C2).

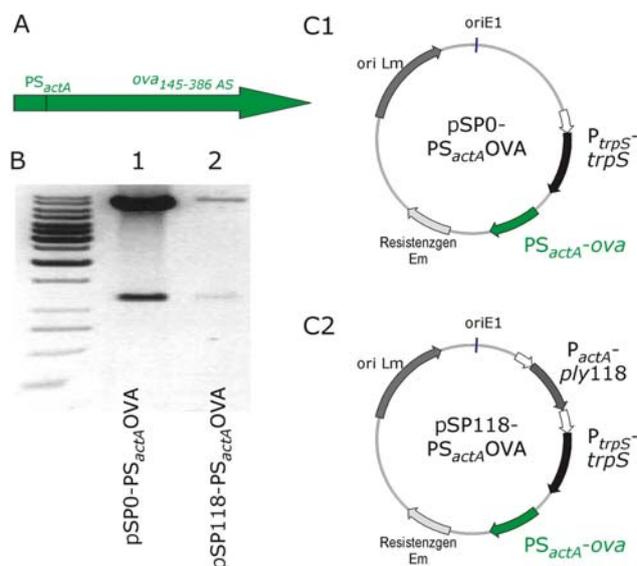


Abb. 5.3: Schematische Darstellung der OVA-Expressionskassette für das „Protein-Delivery“ (A) und die dazugehörige Expressions-plasmide ohne (C1) oder mit (C2) *ply118*-Expressionskassette P_{actA}-ply118. (B1) stellt die 1151 bp große Expressionskassette nach Erhalt durch *Pst*I/*Sac*I-Verdau des Plasmides pSP0-PS_{actA}OVA dar. (B2) Überprüfung eines Klones pSP118-PS_{actA}OVA durch *Pst*I- und *Sac*I-Verdau auf Vorhandensein der 1151 bp großen Expressionskassette PS_{actA}OVA. ori *Lm*, Replikations-ursprung für *Listeria*; oriE1, Replikationsursprung für *E. coli*; *trpS*, essentielles Gen von *Lm* kodiert unter Kontrolle des eigenen Promotors; Em, Resistenzgen.

Alle Plasmide wurden durch Sequenzierung bestätigt. Und da es sich bei allen konstruierten Plasmiden um pSP-Derivate handelt, ist sichergestellt, dass diese stabil und ohne Antibiotikazusatz

in *Lm* replizierbar sind. Durch die Einführung einer essentiellen *trpS* (Tryptophanyl-tRNA Synthetase)-Expressionskassette auf diese Plasmide konnte deren 100%ige Stabilität in einem *trpS*-defizienten *Lm* Stamm *in vivo* erreicht werden [235].

Schließlich wurden alle konstruierten Expressionsplasmide für Ovalbumin in elektrokompetente Zellen der Deletionsmutante *Lm* $\Delta trpS$ transformiert und gegen das ursprünglich in diesem Stamm enthaltene Plasmid *pflotrps* nach Protokoll (\rightarrow 4.2.5) ausgetauscht.

5.1.1.2 Charakterisierung der einzelnen Ovalbumin Expressionsplasmide

5.1.1.2.1 Nachweis der Expression des Ovalbumins

Nach dem Erhalt der Expressionsplasmide wurden diese auf die Expression des Ovalbumins mittels verschiedener Methoden untersucht.

Zunächst wurde das OVA-Expressionsplasmid *pSP118-PCMV OVA* für das „DNA-Delivery“ charakterisiert. Für die Überprüfung des Expressionsplasmides wurden Transfektionsexperimente mit anschließender Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Für diesen Versuchsansatz wurden COS-1 Zellen auf Deckgläschen in einer 24 Napfplatte am Vortag der Transfektion ausgesät. Zur eigentlichen Transfektion wurde 0.4 μ g an reinem Plasmid *pSP118-PCMV OVA* nach dem LipofectAMINE PLUS Reagent Transfection Protokoll der Fa. Invitrogen in COS-1 Zellen (24-Napfplatte) übertragen (\rightarrow 4.4.2.2). 48 h später wurden die transfizierten Zellen auf dem Deckgläschen fixiert und eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung nach Protokoll (\rightarrow 4.6.1) durchgeführt. Zur Visualisierung des exprimierten Ovalbumins wurden die fixierten Zellen mit einem anti-OVA Kaninchenserum (1:500) sowie einem FITC-gekoppelten Ziege Anti-Kaninchen IgG (1:300) inkubiert. Im Anschluß daran wurde der Zellkern durch eine DAPI-Färbung (verdünnt 1:2000) markiert und das Präparat durch eine Fluoreszenzkamera dokumentiert.

Es wurden nur ungefähr 12 Zellen beobachtet, die Ovalbumin exprimiert hatten (Abb.: 5.5). Aber anhand der zusätzlichen Anfärbung der Zellkerne durch DAPI, wurde bei 100-facher Vergrößerung das exprimierte Ovalbumin im Zytsol der Wirtszelle aufgefunden.

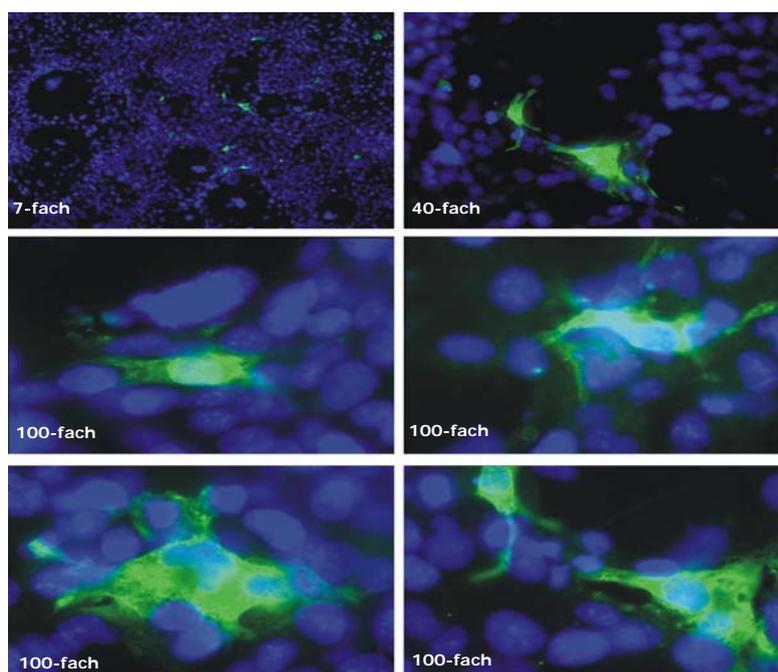


Abb. 5.5: Transfektion von COS-1 Zellen mit dem Plasmid *pSP118-PCMV OVA* des „DNA-Deliverys“. Doppelimmunfluoreszenzanalyse 48 h *p.* I mit Kaninchen anti-OVA + FITC-gekoppelten Ziege Anti-Kaninchen IgG Antikörper zur Anfärbung von exprimiertem Ovalbumin (grün) und DAPI zur Visualisierung des Zellkerne (blau). Die Fluoreszenzbilder stellen eine 7-, 40- und 100-fache Vergrößerung dar.

In einem weiteren Versuchsansatz sollte überprüft werden, ob Listerien fähig sind, das Plasmid pSP118-P_{CMV}OVA in CACO-2 Zellen zu übertragen, so dass das plasmidkodierte OVA anschließend eukaryontisch exprimiert werden kann. Dafür wurden CACO-2 Zellen mit dem „DNA-Delivery“ Stamm *Lm* Δ trpS/pSP118-P_{CMV}OVA infiziert, und nach 72 h *p. I.* wurde eine dreifach Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Zur Visualisierung des exprimierten Ovalbumins wurden die fixierten Zellen mit dem Kaninchenantiserum, gerichtet gegen Ovalbumin (1:500) sowie dem FITC-gekoppelten Ziege Anti-Kaninchen IgG (1:300), inkubiert. Danach wurde das zelluläre Aktin mit TRITC-Phalloidin (1:100) und der Zellkern mit DAPI (1:2000) markiert und die Präparate am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

Wie in der Übereinanderlagerung der drei aufgenommenen Fluoreszenzbilder in Abb. 5.6 zu sehen ist, waren die Trägerstämme intrazellulär indirekt durch die Anfärbung des zellulären Aktins nachzuweisen. Auch das exprimierte OVA konnte beobachtet werden. Damit haben Listerien das Expressionsplasmid für das „DNA-Delivery“ in CACO-2 Zellen freigesetzt, so dass daraufhin die Wirtszellen fähig waren, das Ovalbumin zu exprimieren.

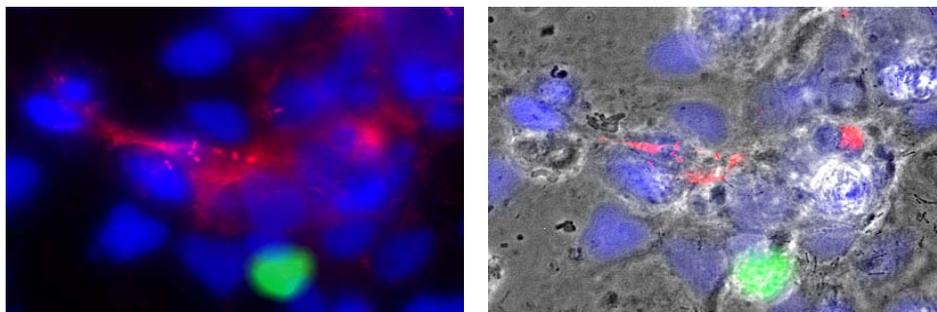


Abb. 5.6: Overlays einer Dreifachimmunfluoreszenzanalyse nach Infektion von CACO-2 Zellen mit dem Stamm *Lm* Δ trpS/pSP118P_{CMV}OVA, der die PLamid-DNA überträgt. Kaninchen anti-OVA + FITC-gekoppelten Ziege Anti-Kaninchen Antikörper dienen zur Anfärbung von exprimiertem Ovalbumin (grün), DAPI zur Visualisierung des Zellkerns (blau) und TRITC-Phalloidin zur indirekten Anfärbung der Listerien.

Anschließend folgten Western Blot Analysen zur besseren Quantifizierung der eukaryontischen Ovalbumin Expression. Es wurden alle Expressionsplasmide, welche Ovalbumin für das „Protein-Delivery“ (pSP118-PS_{actA}OVA), für das „DNA-Delivery“ (pSP118-P_{CMV}OVA) und für das „RNA-Delivery“ (pCSA1+pCSB-OVA) kodieren, in COS-1 Zellen transfiziert (\rightarrow 4.4.2.2). Drei Tage nach Transfektion wurden Zellextrakte (\rightarrow 4.3.2) hergestellt und Western Blot Analysen (\rightarrow 4.3.5) durchgeführt.

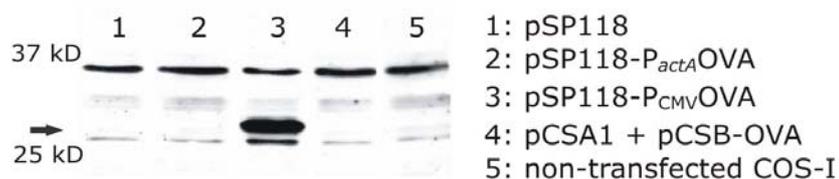


Abb. 5.7: Nachweis der Expression des verkürzten OVAs (\sim 27 kD, schwarzer Pfeil weist darauf) durch COS-1 Zellen 3 Tage nach Transfektion der OVA Expressionsplasmide im Western Blot. Zur Detektion des Ovalbumins diente ein anti-OVA Kaninchenserum und der sekundäre Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen IgG Antikörper.

Wie erwartet wurde ein verkürztes Ovalbumin (~ 27 kD) nur in Zellen nachgewiesen, die mit dem Plasmid pSP118-P_{cmv}OVA transfiziert worden waren. Nur dieses Plasmid ermöglichte es, dass Wirtszellen das Ovalbumin transkribierten und translatierten, da die *ova*-Sequenz unter der Kontrolle des eukaryotischen CMV-Promotors kloniert wurde (Abb.: 5.7, Spur 3).

Für den Nachweis der OVA-Expression durch die Trägerbakterien selbst mit anschließendem Export des Proteins über die Zellwand wurden alle *Lm* Stämme mit den enthaltenen Plasmiden für die einzelnen „Delivery“-Strategien bis zur spätlogarithmischen Phase von 1.0 bei 600 nm in BHI Medium kultiviert. Anschließend wurden die intrazellulären und die exportierten listeriellen Proteine nach Protokoll (\rightarrow 4.3.1) isoliert. Die Detektion der Ovalbuminexpression erfolgte im Western Blot mittels dem anti-OVA Kaninchenserum und dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen IgG Antikörper.

Im Western Blot wurde ein verkürztes Ovalbumin Protein (~ 27 kD) sowohl im listeriellen Zellpellet als auch im Kulturüberstand (Abb.: 5.8, Spur 2 und 7) des Stammes *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-PS_{actA}OVA detektiert, welcher OVA exprimiert und exportierte. Die Trägerbakterien, die DNA übertrugen (*Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-P_{CMV}OVA) oder mRNA produzierten (*Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB-OVA) oder auch die Kontrollstämme *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118 und *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB-OVA die keine OVA-Expressionskassetten aufweisen, zeigten dagegen, wie erwartet, keine Expression des Ovalbumins (Abb. 5.8, Spur 3,4,8 und 9).

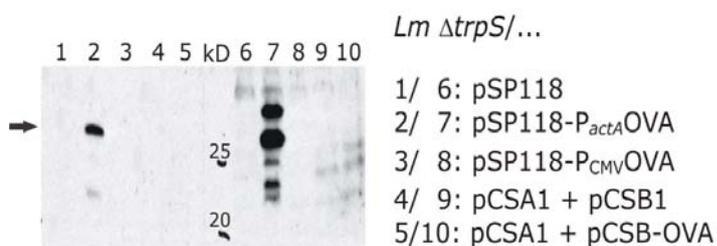


Abb. 5.8: Die Detektion der Expression des verkürzten OVAs (~ 27 kD) in Zellextrakten und Kulturüberständen der *Lm* Trägerstämme in Western Blot Analysen; Spur 1-5 Überstandsproteine und Spur 6-10 zelluläre Proteine. Schwarzer Pfeil weist auf die OVA Bande

Anschließend folgte der Nachweis der bakteriellen OVA-Transkripte, welche auf dem Plasmiden für die „Protein-Delivery“- (pSP118-PS_{actA}OVA) und „RNA-Delivery“-Strategie (pCSA1+pCSB-OVA) kodiert vorliegen, durch Slot-Blot Analysen (\rightarrow 4.1.2.3). Dafür wurden alle *Lm* Stämme mit den enthaltenen Plasmiden für die einzelnen „Delivery“-Strategien und dem Kontrollstamm $\Delta trpS$ /pSP118 bis zur spätlogarithmischen Phase von 1.0 bei 600 nm in BHI Medium kultiviert. Anschließend wurde RNA aus den Pellets der jeweiligen Stämme isoliert und als Proben (5 μ g) in der Slot-Blot-Analyse eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde reines Plasmid pSP0-PS_{actA}OVA und als Negativ-Kontrolle RNA aus dem WT Stamm *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118 verwendet. Die transkribierte OVA-mRNA wurde dabei chemilumineszierend durch die Anhybridisierung einer spezifischen OVA-Sonde, welche zuvor mit dem Primerpaaren ovacheckfor und ovacheckrev aus dem Plasmid pSP0-PS_{actA}OVA amplifiziert und anschließend mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt wurde, detektiert (Abb.: 5.9).

Die OVA-mRNA wurde tatsächlich nur in den Stämmen *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-PS_{actA}OVA und *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB-OVA nachgewiesen, welche fähig sind, die mRNA zu transkribieren. Dem Kontrollstamm oder auch dem Stamm *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-P_{CMV}OVA, der die OVA-DNA überträgt, ist

es nicht möglich OVA mRNA zu transkribieren, demnach wurde RNA in diesen Stämmen auch nicht detektiert.

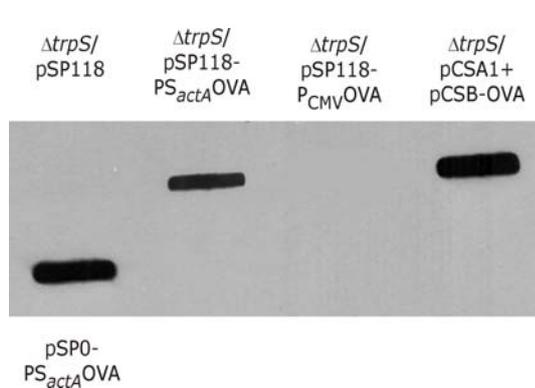


Abb. 5.9: Nachweis der OVA-Transkripte in den „Protein-Delivery“- ($\Delta trpS/pSP118$ -PSactOVA) und „RNA-Delivery“-Stämmen ($\Delta trpS/pCSA1+pCSB$ -OVA) mittels Slot-Blot-Analyse. Alle „Delivery“-Stämme wurden bis zu einer OD von 1.0 bei 600 nm kultiviert und anschließend wurde die RNA aus diesen isoliert und eine Slot-Blot-Analyse durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle ist das reine Plasmid pSP0-PSactOVA und als Negative-Kontrolle die RNA aus dem WT Stamm $\Delta trpS/pSP118$ und dem DNA-übertragenden Stamm $\Delta trpS/pSP118$ -P_{CMV}OVA aufgetragen worden.

Der Nachweis der OVA-Expression nach Freisetzung von OVA als Protein, als DNA oder mRNA in CACO-2 Zellen durch die entsprechenden Trägerstämme gestaltete sich als schwierig. Zunächst wurden dafür CACO-2 Zellen mit den Trägerstämmen und den beiden Kontrollstämmen *Lm* $\Delta trpS/pSP118$ und *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB1$ in einer MOI von 50 infiziert, um anschließend einen „Gentamicin Survival Assay“ durchzuführen (\rightarrow 4.4.2.1.3). Für Western Blot Analysen wurden Zellextrakte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (24 h, 48 h, 72 h) hergestellt. Das exprimierte OVA wurde dabei durch das anti-OVA Kaninchenserum mit nachfolgender Komplexbildung durch den sekundären Peroxidase-konjugierten Ziege Anti-Kaninchen IgG Antikörper mit Hilfe des ECL-Kits chemilumineszierend (\rightarrow 4.3.5.2.2) detektiert.

In mehreren wiederholten Experimenten wurde die OVA-Expression nur in Zellextrakten, welche mit DNA-übertragenden Stämmen $\Delta trpS/pSP118$ -P_{CMV}OVA infiziert wurden, nachgewiesen (Abb.: 5.10, Spur 3). Dabei konnte eine OVA-Bande erst in den 48 h- und vermehrt in den 72 h-Zellextrakten detektiert werden. Ein repräsentativer Versuch in dem CACO-2 Zellen 72 h lang mit den drei Trägerstämmen infiziert wurden, ist nachfolgend abgebildet.

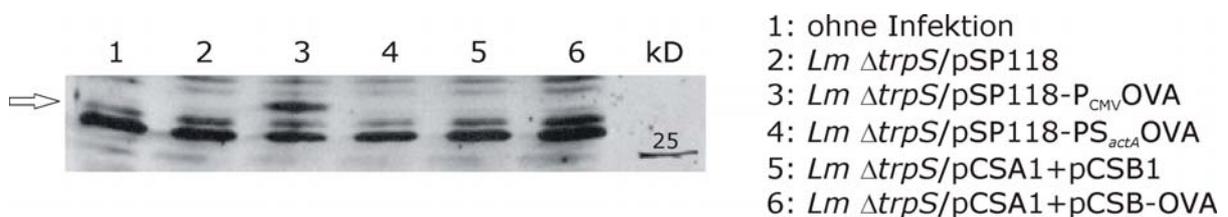


Abb. 5.10: Nachweis der OVA Expression in CACO-2 Zellextrakten 72 h nach Infektion mit den „Delivery“-Stämmen durch Western Blot Analysen mittels eines anti-OVA Kaninchenantiseraums und dem sekundären Peroxidasekonjugierten Anti-Kaninchen IgG Antikörper. Negativ-Kontrollen stellen die beiden Stämme $\Delta trpS/pSP118$ und $\Delta trpS/pCSA1+pCSB1$ und die Zellextraktprobe ohne Infektion dar. Der Stamm $\Delta trpS/pSP118$ -PSactAOVA dient für die Strategie des „Protein-Deliverys“, der Stamm $\Delta trpS/pSP118$ -P_{CMV}OVA für das „DNA-Delivery“ und der Stamm $\Delta trpS/pCSA1+pCSB$ -OVA für das „RNA-Delivery“.

Aus anderen Arbeiten mit EGFP als Modellprotein ist bekannt, dass die Effizienz der EGFP-Expression durch den Wirt am Tag 3 nach Infektion mit den DNA-Trägerbakterien am größten ist, wohingegen eine EGFP-Expression schon in den ersten 4-24 Stunden durch vorherige RNA Freisetzung zu sehen

ist [266]. Aufgrund dessen wurden in nachfolgenden Experimenten die Zellen nur noch 24 Stunden mit den jeweiligen Trägerstämmen infiziert, so dass eine mögliche OVA-Expression durch die „RNA-Delivery“- und „Protein-Delivery“-Stämme erzielt werden könnte. Außerdem wurde eine sensitivere Methode, die Immunpräzipitation, für die Detektion des exprimierten Ovalbumins verwendet (→ 4.3.3).

Dabei wurde eine OVA-Bande nur in den Zellextrakten, die mit den RNA-übertragenden Stämmen (Abb.: 5.11, Spur 5) infiziert wurden, detektiert. Es wurde jedoch keine OVA-Expression in den Zellextrakten nachgewiesen, die mit den Listerien infiziert wurden, welche das Protein oder die DNA übertragen (Abb.: 5.10, Spur 3 und 4). Durch Literaturrecherche ist bekannt, dass listerielle sekretierte Proteine wie z.B. LLO sehr schnell im Zytosol von Wirtszellen degradiert werden und dass diese erst durch die Verwendung eines Proteasominhibitors im Wirtszellzytosol nachgewiesen werden konnten [304]. Deshalb wurde hier auch Lactacystin [103], ein spezifischer, irreversibler Proteasominhibitor zusätzlich zu Protease- und Phosphataseinhibitoren verwendet. Trotzdem konnte aber mit den davor genannten *Lm* Stämmen kein positives Ergebnis erzielt werden.

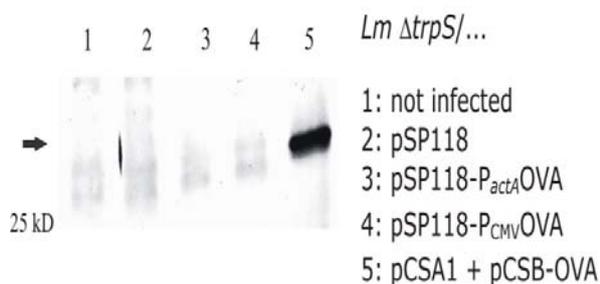


Abb. 5.11: OVA Expression (~ 27 kD) von CACO-2 Zellen 24h nach Infektion mit 50 CFU/Zelle der *Lm* Trägerstämmen. Proteine wurden per Immunpräzipitation mit anschließendem Western Blot unter Verwendung eines anti-OVA Kaninchen-serums und dem sekundären Anti-Kaninchen IgG Antikörper detektiert. Pfeil weist auf das verkürzte OVA Protein.

5.1.1.2.2 Wachstumsverhalten der *Lm* Trägerstämmen im Vollmedium BHI

Anschließend wurde untersucht, ob die jeweiligen Expressionsplasmide für Ovalbumin einen Einfluss auf das Wachstum der Listerien haben. Die *Lm* Trägerstämmen $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$, $\Delta trpS/pSP118-PCMV OVA$ und $\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$ und die Kontrollstämmen $\Delta trpS/pSP118$ und $\Delta trpS/pCSA1+pCSB1$ wurden bei 37 °C in BHI-Medium nach Protokoll kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten die optische Dichte bei 600 nm im Spektralphotometer der Kulturen bestimmt, um anschließend Wachstumskurven zu erstellen (→ 4.2.6). Die *Lm* $\Delta trpS$ Stämme, die die Plasmide $pSP118-PCMV OVA$ oder $pSP118-PS_{actA}OVA$ replizieren, welche für die Übertragung von Ovalbumin als plasmidkodierte DNA oder als Protein fungieren, zeigten ein ähnliches extrazelluläres Wachstumsverhalten bei Kultivierung im BHI-Medium (Abb. 5.12: rote und grüne Kurve). Auch der Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118$, der als Negativ-Kontrolle für die Protein- und DNA-übertragenden Stämme in späteren *in vivo* Anwendungen verwendet wurde, zeigte eine vergleichbare Wachstumsrate. Dagegen wies der *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$ Stamm, der die OVA-mRNA überträgt, ein reduziertes Wachstum im BHI-Medium auf (Abb. 5.12: gelbe Kurve), vergleichbar mit seinem Kontrollstamm *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB1$. Das in Abb. 5.12 dargestellte Ergebnis repräsentiert einen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsansätzen.

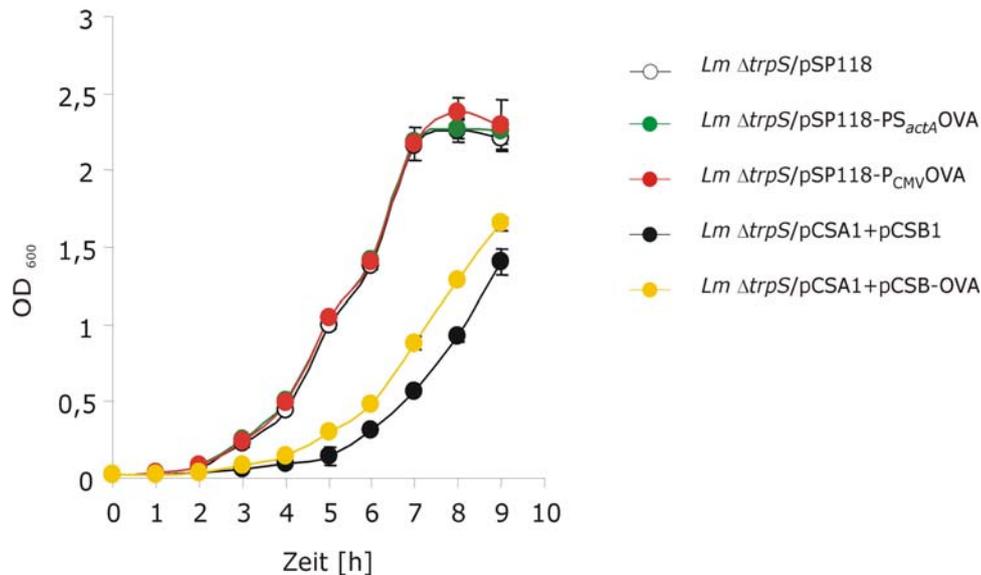


Abb. 5.12: Wachstumskurven der *Lm* Stämme mit den jeweiligen OVA-Expressionsplasmiden im BHI Medium. *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB1$ (negativ Kontrolle) und *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$ stellen Stämme für die „RNA-Delivery“-Strategie dar. *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PCMV OVA$ dient als „DNA-Delivery“-Stamm, *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA} OVA$ als „Protein-Delivery“-Stamm und *Lm* $\Delta trpS/pSP118$ als deren Kontrollstamm. Die optische Dichte der Kulturen wurde bei 600 nm gemessen. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung.

5.1.1.2.3 Wachstumsverhalten der Trägerstämme in P388.D1 Makrophagen

Bevor die autolysierenden *Lm* Stämme für die jeweiligen Impfstoffstrategien („Protein-Delivery“, „RNA-Delivery“ und „DNA-Delivery“) in *in vivo* Versuchen eingesetzt wurden, sollte vorher das intrazelluläre Verhalten dieser Stämme in P388.D1 Makrophagen im Vergleich zu dem autolysierenden wildtypischen Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118$ und dem RNA-Kontrollstamm *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB1$ untersucht werden. Dafür wurden P388.D1 Makrophagen am Vortag der Infektion in 24-Napfplatten ausgesät und 24 h später wurde ein „Gentamicin-Survival Assay“ (→ 4.4.2.1.3) mit den zu untersuchenden Trägerstämmen in einer MOI von 5 durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 3 h, 5 h und 7 h) wurde die Infektion gestoppt, die Wirtszellen lysiert, sonifiziert und die Anzahl an lebenden intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt.

Wie in Abb. 5.13, A zu sehen ist, weisen drei der fünf eingesetzten Stämme eine Reduktion in der Internalisierung durch Makrophagen auf. Dabei wurde der Protein-übertragende Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA} OVA$ zweimal und der RNA-übertragende Stamm *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$ sowie dessen Kontrollstamm *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB1$ sogar sechs- bis achtmal schlechter als der WT *Lm* $\Delta trpS/pSP118$ phagozytiert. Deshalb waren eine Stunde nach Infektion weniger von diesen Trägerstämmen zu finden als wildtypische Stämme. Der DNA-übertragende Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PCMV OVA$ wurde dagegen genauso gut wie der WT aufgenommen.

Auch in der intrazellulären Replikation (Abb. 5.13, B) zeigten die verwendeten Stämme Unterschiede auf. Im Vergleich zum DNA-übertragenden Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PCMV OVA$ der intrazellulär hochwuchs, vermehrte sich der Protein-übertragende Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA} OVA$ nicht mehr. Nur wenige Bakterien dieses Stammes wurden schon nach 3 Stunden

Infektion intrazellulär gefunden. Im weiteren Infektionsverlauf wurden sogar noch weniger intrazelluläre Bakterien nachgewiesen. Daher erweist sich der Protein-übertragende Stamm durch die zusätzliche Expression des Ovalbumins als replikationsdefizient. Der Stamm, der die RNA freisetzte und auch sein Kontrollstamm vermehrten sich intrazellulär dagegen mit vergleichbaren Raten. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit nicht-phagozytischen Zelllinien wie CACO-2 oder COS-1 Zellen erhalten.

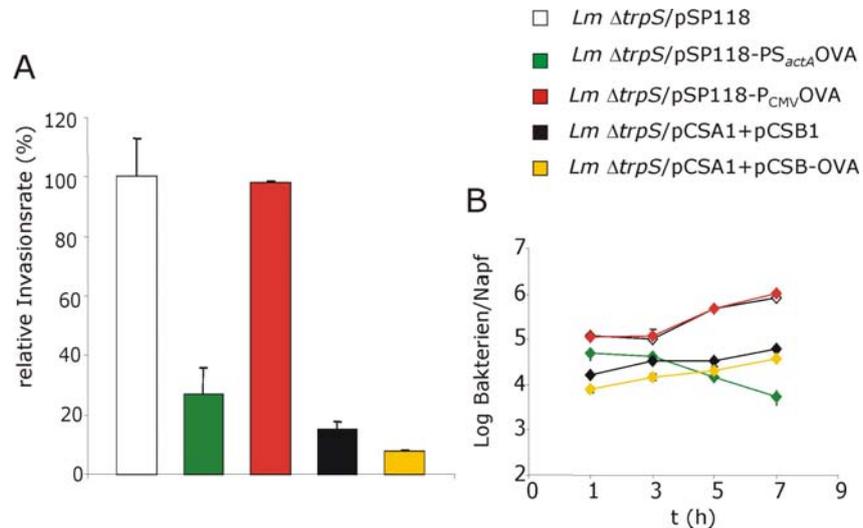


Abb. 5.13: Invasion (A) und Replikation (B) der Trägerstämme *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$ („Protein-Delivery“), *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PCMV OVA$ („DNA-Delivery“), *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB1-OVA$ („RNA-Delivery“) und der Kontrollstämme *Lm* $\Delta trpS/pSP118$ und *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB1$ in P388.D1 Makrophagen. Farbige Balken und Symbole entsprechen den Mittelwerten aus drei Versuchsansätzen mit jeweiliger Standardabweichung eines repräsentativen Versuches von zwei durchgeführten.

5.1.1.2.4 Intrazelluläres Verhalten der Trägerstämme nach Infektion der Wirtszelle

Um das intrazelluläre Verhalten der Trägerstämme *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$, *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PCMV OVA$ und *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB1-OVA$ genauer beschreiben zu können, wurden zusätzlich Immunfluoreszenz-Versuche mit intrazellulär-markierten Bakterien in COS-1 Zellen durchgeführt. Dafür wurden COS-1 Zellen mit den jeweiligen Stämmen für Ovalbumin als Protein, als plasmidkodierte DNA oder mRNA in einer MOI von 50 infiziert. Diese hohe MOI diente dazu, dass trotz der reduzierten Invasionsfähigkeit dieser Stämme (Abb. 5.13, A) anschließend genügend intrazelluläre Bakterien auffindbar waren. Nach Fixierung des Zellrasens 6 h, 24 h oder 48 h *p. i.* wurden die Zellen mit einem anti-ActA Kaninchenserum (1:300) markiert, gefolgt von einer zweiten Inkubation mit einem FITC-gekoppelten Ziege Anti-Kaninchen-IgG (1:100).

Folgende Beobachtungen wurden am Fluoreszenzmikroskop gemacht: Schon 6 h nach der Infektion wurden alle drei Stämme in den infizierten Zellrasen gefunden, jedoch zeigten Zellen, welche mit dem Protein-übertragenden Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$ infiziert wurden, eine deutlich geringere Anzahl an intrazellulärmarkierten Bakterien auf. Nach 24 und 48 h *p. i.* konnte nur bei den DNA- und RNA-übertragenden Stämmen eine Vergrößerung der Infektionsherde beobachten werden, was bedeutet, dass diese zur intrazellulären Vermehrung und interzellulären Motilität in diesem Zeitfenster fähig waren. Dabei zeigte der Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PCMV OVA$ die stärkste intrazelluläre Vermehrung und interzelluläre Ausbreitung. Stark vereinzelt Bakterien des Protein-

übertragenden Stammes *Lm* $\Delta trpS/PS_{actA}OVA$ wurden nur in wenigen (1-3) polarisierten Infektionsherden noch nach 24 h, jedoch nicht mehr nach 48 h *p. i.* beobachtet.

Insgesamt konnte bei keinem der drei „Delivery“-Stämme die erwartete polare Verteilung des ActA Proteins an den Zellpolen des Bakteriums nachgewiesen werden [242]. Vielmehr zeigten Sie ein unregelmäßiges Verteilungsmuster des Proteins über die gesamte Bakterienoberfläche (Abb.: 5.14). Dieses Verteilungsmuster wurde auch schon am autolysierenden WT Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118$ beobachtet [233].

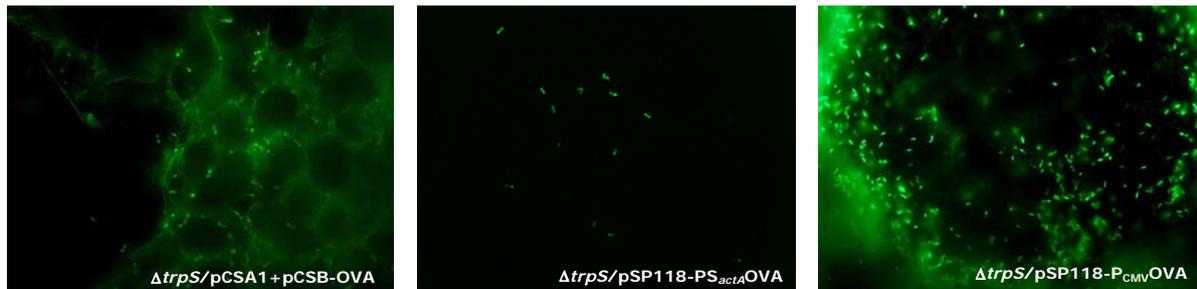


Abb. 5.14: ActA-Markierung der drei Stämme *Lm* $\Delta trp/pCSA1+pCSB-OVA$, *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PCMVOVA$ und *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$. Ausbreitung der *Lm* Stämme in COS-1 Zellen 24 h nach Infektion und ActA-Verteilung auf der Oberfläche der intrazellulären Bakterien.

Aufgrund der unterschiedlichen intrazellulären Vermehrung und interzellulären Ausbreitung stellte sich anschließend die Frage, ob diese Bakterien auch unterschiedlich das Aktin der Wirtszelle rekrutieren können. Dafür wurden neben den erwähnten Antikörpern die Versuchsansätze noch zusätzlich mit TRITC-Phalloidin inkubiert, um das zelluläre Aktin zu visualisieren.

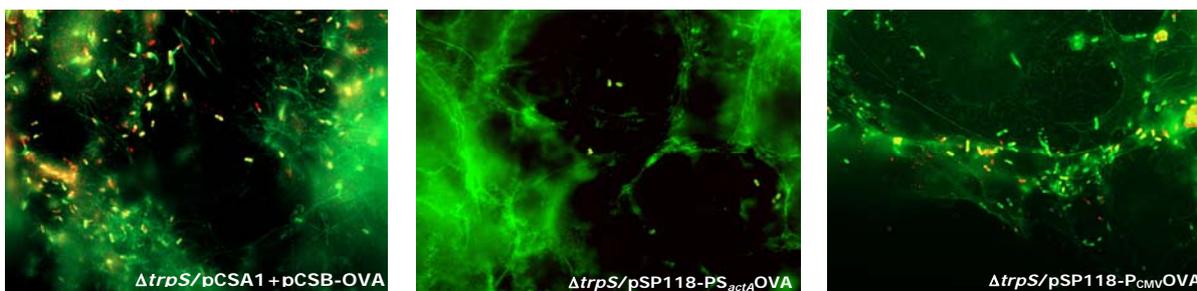


Abb. 5.15: Anti-ActA und Phalloidin-Färbung von intrazellulären Bakterien der Stämme *Lm* $\Delta trp/pCSA1+pCSB-OVA$, *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PCMVOVA$ und *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$ in Cos-1 Zellen 24h nach Infektion.

Anhand der Aktinfärbung wurde in Zellrasen, welche mit dem RNA- oder DNA-übertragenden Stamm infiziert wurden, erkannt, dass diese Listerien Aktinschweife ausgebildet hatten und somit zur intrazellulären Bewegung und interzellulären Ausbreitung in benachbarte Zellen fähig waren. Der Stamm *Lm* $\Delta trpS/PS_{actA}OVA$, der das OVA exportierte, zeigte dagegen keine Ausbildung von Aktinschweifen, und somit war dieser nicht zur intrazellulären Bewegung und interzellulären Ausbreitung fähig (Abb.: 5.15). Demnach scheint dieser Stamm neben dem Replikationsdefizit, das in „Gentamicin-Survival Assays“ in P388.D1 Makrophagen nachgewiesen wurde (Abb. 5.13, A), auch ein Defizit in der Rekrutierung von zellulärem Aktin zu haben.

5.1.1.2.5 Virulenzattenuation des autolysierenden Stammes *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118 *in vivo*

Für nachfolgende *in vivo* Versuche in der C57BL/6 Maus musste die optimale intravenöse (*i.v.*) Applikationsdosis der Ply118-exprimierende (autolysierende) *Lm* Trägerstämme bestimmt werden. Aus älteren Experimenten ist bekannt, dass die orogastrische Applikation solcher autolysierender *Lm* Stämme zu einer deutlichen Reduktion (5 log) der Bakterienanzahl in Leber und Milz von BALB/c Mäusen führte [235]. Deshalb war die Theorie, dass auch nach einer *i.v.* Applikation die Anzahl an autolysierenden Bakterien in den Organen Leber und Milz reduziert sein sollte.

Zuerst wurde die Anzahl an Bakterien am Tag 3 nach *i.v.* Infektion von C57BL/6 Mäusen im Vergleich zum nicht-autolysierenden Wildtyp *Lm* $\Delta trpS$ /pSP0 bestimmt. Der Tag 3 gilt als der Tag im normalen Infektionsverlauf, an dem die meisten intrazellulären Listerien in diesen Organen zu finden sind. Dafür wurden zwei Gruppen von je 5 Mäusen mit einer Dosis von 5×10^3 CFU an nicht-autolysierenden Stämmen *Lm* $\Delta trpS$ /pSP0 und autolysierenden *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118 Stämmen *i.v.* infiziert. Diese Gruppen dienten zum direkten Vergleich, da dieselbe Infektionsdosis verwendet wurde. Eine Dosis von 5000 wildtypischen Listerien kann man maximal in C57BL/6 Mäuse applizieren ohne dass die Mäuse sterben (LD_{50} liegt bei 5×10^4 [76]). Die dritte Mausgruppe wurde dagegen mit 5×10^7 CFU an autolysierenden *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118 Stämmen *i.v.* infiziert. Diese 4-Log höhere Dosis sollte in den nachfolgenden adoptiven Transferexperimenten verwendet werden, da durch Literaturrecherche bekannt ist, dass eine direkte Abhängigkeit im „Priming“-Prozess zwischen der CD8 T-Zell-Expansion, der Infektionsdosis so wie der Menge des Antigens, das den CD8 T-Zellen präsentiert wird, besteht [211, 12]. Am Tag 3 nach der Infektion wurden den Tieren Leber und Milz entnommen, um anhand der Bakterienanzahl in den Organen die Virulenzattenuation zu beurteilen.

Alle Mäuse aus den drei Gruppen zeigten keine sichtbaren Krankheitszeichen wie z. B. struppiges Fell, verlorener Spieltrieb oder Appetitlosigkeit. Anschließend wurden alle Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Organe Milz und Leber den Tieren entnommen. Es wurden Organsuspensionen durch Homogenisieren hergestellt und anschließend wurden diese mit Ultraschall behandelt, um ein weiteres Aufschließen der Wirtszellen zu gewährleisten. Danach wurde die Bakterienzahl in den Organen durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt.

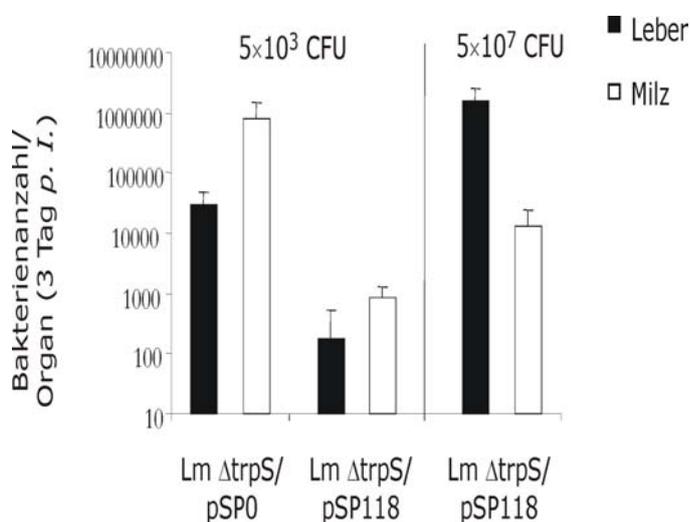


Abb. 5.17: Bakterienzahlen in Leber und Milz am Tag 3 nach *i.v.* Infektion von C57BL/6 Mäuse mit 5×10^3 CFU nicht-autolysierenden *Lm* $\Delta trpS$ /pSP0 und 5×10^3 CFU autolysierenden *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118 Stämmen. Eine dritte Gruppe wurde außerdem mit 5×10^7 CFU autolysierenden *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118 Stämmen infiziert (rechts vom Teilstrich). Die Balken entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen der Bakterienzahlen in den Organen der infizierten Mausgruppen bestehend aus je 5 Mäusen.

Wie in Abb. 5.17 zu sehen ist, lag eine um 3 Log reduzierte Anzahl an autolysierenden Bakterien (*Lm* Δ *trpS*/pSP118) in Leber und eine um 2 Log reduzierte Anzahl in Milz im Vergleich zum WT vor, wenn dieselbe Applikationsdosis verwendet wurde. Spritzte man dagegen eine um 4 log höhere Dosis an autolysierenden Bakterien in die Mäuse, so fand man eine größere Menge an Bakterien in den Organen, vergleichbar zum WT mit 5×10^3 . Vor allem wies die Leber dieser Mausgruppe eine größere Anzahl an Listerien, als die Milzen auf. Demnach scheint das Phagenlysin 118 nicht sehr effektiv in infizierten Leberzellen auf Bakterien zu wirken.

Um die Virulenzattenuation des Stammes *Lm* Δ *trpS*/pSP118 in Mäusen sicher zu bestätigen, wurde ein weiterer *in vivo* Versuch durchgeführt. Gleichzeitig sollte damit auch festgestellt werden, ob das plasmidkodierte Phagenlysin in den Listerien aus der dritten Gruppe des vorherigen Versuches *in vivo* durch Mutationen inaktiviert wurde. Mutationen in dem Plasmid könnten durch den Selektionsdruck innerhalb der Listerien auftreten, da das unter dem *actA*-Promotor stehende Phagenlysin für die Listerien von Nachteil ist. Außerdem wurde spekuliert, dass es unwahrscheinlich ist, das Phagenlysin-tragende Listerien nach einigen Infektionstagen noch aus den Organen reisoliert werden können. Außerdem sind Phagenlysine Enzyme, die in Sekunden ihre Wirkung entfalten. Deshalb wurden 20 *Lm* *trpS*/pSP118 Klone aus der dritten Gruppe des vorherigen Versuches rekultiviert und jeweils ein Klon in eine von 20 C57BL/6 Mäusen mit einer geringen Dosis von 5×10^3 CFU injiziert. Am Tag 3 nach Infektion wurde durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen der Organsuspensionen die Bakterienanzahl bestimmt.

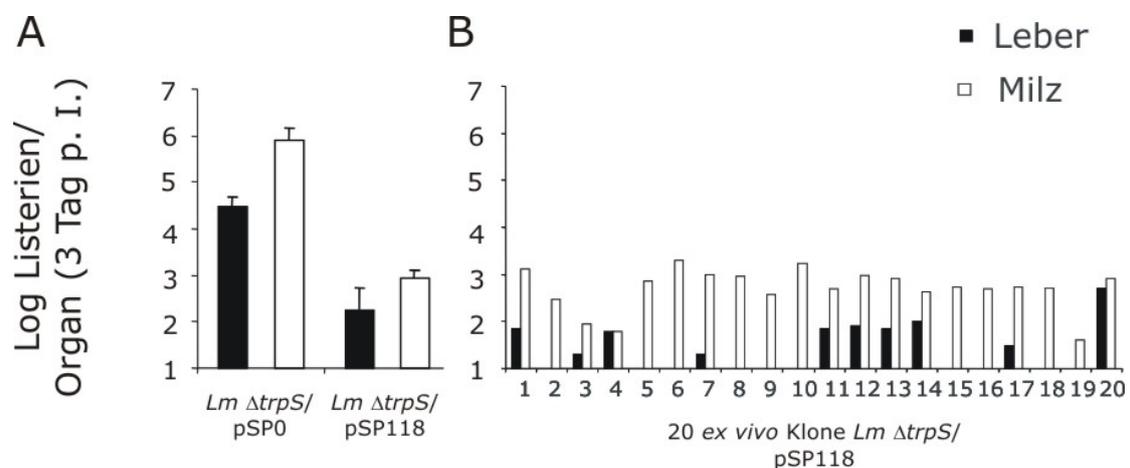


Abb. 5.18: (A) Vorheriger Versuch zum Vergleich noch mal dargestellt (siehe Abb. 5.17). (B) Bakterienzahlen in den Organen Leber und Milz am Tag 3 nach *i.v.* Infektion von jeweils eines *ex vivo* Klones des autolysierenden Stammes *Lm* Δ *trpS*/pSP118 in einer Dosis von 5×10^3 CFU in eine von 20 C57BL/6 Mäusen. Balken entsprechen der Bakterienanzahl in einer Maus.

Es zeigte sich dieselbe Tendenz wie im vorherigen Versuch (Abb.: 5.18, A). Eine geringere Anzahl an Listerien war in den Organen Leber und Milz nachzuweisen (Abb.: 5.18, B). Damit liegt eine Virulenzattenuation des Stammes *Lm* Δ *trpS*/pSP118 *in vivo* vor. Zusätzlich wurde das Phagenlysin Ply118 in allen Zellextrakten der 20 *ex vivo* Klone in einer Western Blot Analyse mittels eines anti-Ply118 Kaninchenserums nachgewiesen (Abb.: 5.19), um sicher zugehen, dass das Phagenlysin wirklich noch von den rekultivierten Klone exprimiert wurde.

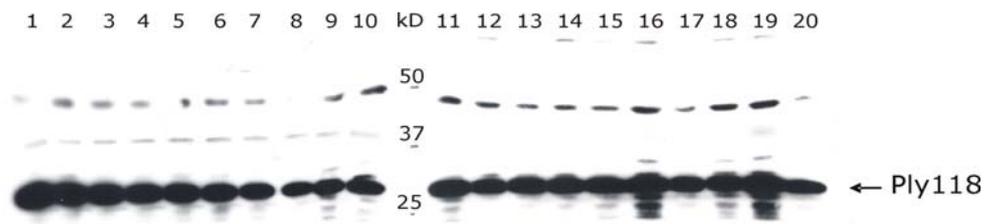


Abb. 5.19: Nachweis der bakteriellen Expression des Phagenlysins Ply118 durch die 20 ex vivo Klone mittels Western Blot Analyse unter Verwendung des anti-Phagenlysin118 Serums und des sekundären Ziege anti-Kaninchen Peroxidase-Konjugat.

Da mit der 4 Log höheren Applikationsdosis (5×10^7 statt 5×10^3) des autolysierenden Stammes *Lm* $\Delta trpS/pSP118$ eine erhöhte Beladung von intrazellulären Listerien in den Organen Milz und Leber der infizierten Tiere am Tag 3 gefunden wurde (Abb.: 5.17), sollte nachfolgend auch die Bakterienzahlen in den Organen Leber und Milz eines jeden Tages in einem Infektionsverlauf von 7 Tagen bestimmt werden. Dieser Verlauf diene ebenso zur besseren Charakterisierung des autolysierenden Stammes *Lm* $\Delta trpS/pSP118$ im Vergleich zum nichtautolysierenden WT Stammes *Lm* $\Delta trpS/pSP0$. Dazu wurden 25 C57BL/6 Mäuse (5×5) mit 5×10^3 CFU an *Lm* $\Delta trpS/pSP0$ und weitere 25 C57BL/6 Mäuse (5×5) mit 5×10^7 CFU *Lm* $\Delta trpS/pSP118$ intravenös infiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten (4 h, 1 Tag, 3 Tag, 5 Tag und 7 Tag) wurden die Organe Milz und Leber aus jeweils 5 Tieren der beiden Gruppen herauspräpariert, um die Bakterienzahlen in diesen Organen durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen zu bestimmen. Außerdem wurde vorher Blut aus dem Herzen entnommen, um später im Serum die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) nachzuweisen. Dabei dient eine messbare Erhöhung an GPT im Serum als Nachweis einer Zellschädigung der Leber.

Am Beginn des Infektionsverlaufs befanden sich 1×10^6 autolysierende Listerien im Leberhomogenisat, eine bakterielle Ladung, die 4 Log höher liegt als diejenige, welche in Mäusen, die mit 5×10^3 ($0.5 \times LD_{50}$) nicht-autolysierender Listerien (Kontrollplasmid pSP0) infiziert wurden, gefunden wurden (Abb. 5.20, A). Im weiteren Infektionsverlauf blieb diese bakterielle Ladung in den infizierten Lebern während den ersten drei Tagen konstant und anschließend verkleinerte sie sich. Die Anzahl der Kontrollbakterien ergab dagegen den typischen Peak am Tag 3.

Im Gegensatz zur Leber, konnte ein anderer Infektionsverlauf in der Milz beobachtet werden. Während des Infektionsverlaufes verringerte sich die Anzahl an autolysierenden Listerien konstant in der Milz, wohingegen sich die Kontroll-Listerien in den Milzen bis zum Tag 3 typisch vermehrten (Abb.: 5.20, B).

Auch der Level an Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) im Serum der Tiere, welche mit autolysierenden Listerien infiziert waren, erhöhte sich signifikant in den ersten drei Tagen (Abb.: 5.20, C). Dies wies daraufhin, dass eine Leberschädigung durch die intrazellulär replizierenden Bakterien verursacht wurden, die anscheinend nicht durch Ply118 lysierten. Zusammengefasst kann man sagen, dass die Autolysis der Trägerbakterien durch das Phagenlysin 118 besser in Milzzellen als in Leberzellen wirkte. Jedoch war die Infektion mit 5×10^7 CFU autolysierenden *Lm* $\Delta trpS/pSP118$ Stämmen schneller ausgeheilt als die mit den 5×10^3 CFU Kontroll-Listerien $\Delta trpS/pSP0$.

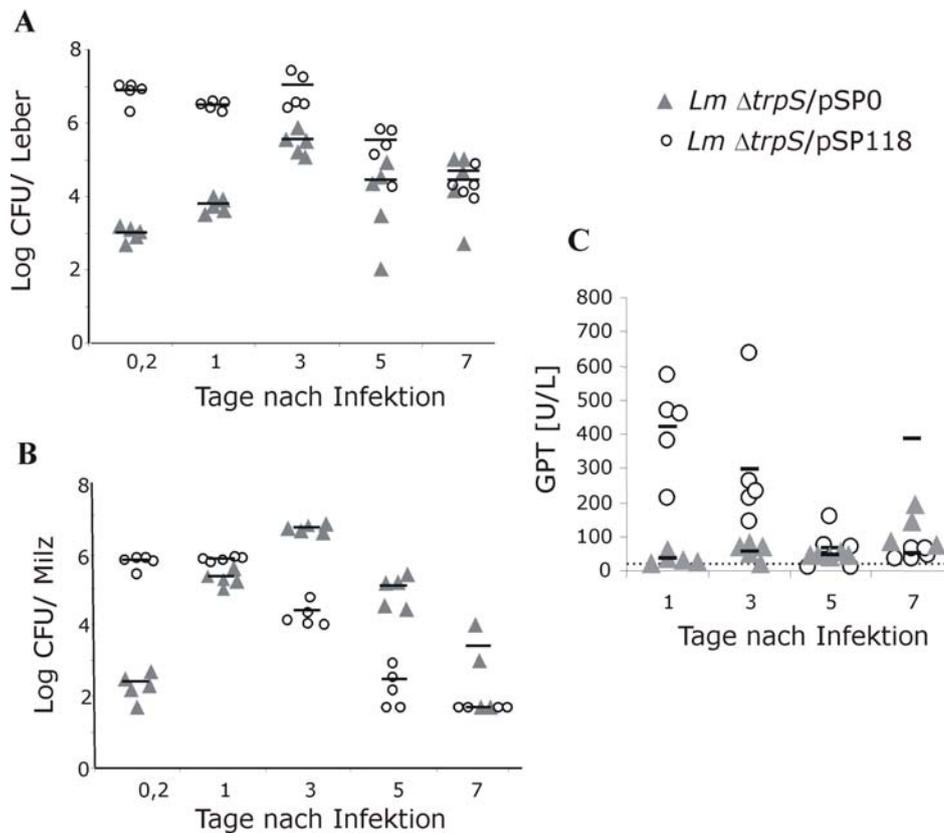


Abb. 5.20: Bakterienanzahl in Leber und Milz von *i.v.* infizierten C57BL/6 Mäusen mit nicht-autolysierenden 5×10^3 CFU *Lm* $\Delta trpS/pSP0$ ($0.5 \times LD_{50}$) und autolysierenden 5×10^7 CFU *Lm* $\Delta trpS/pSP118$ Stämmen. Anzahl an Bakterien in Lebern (A) und in Milzen (B) der infizierten Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion. (C) GPT-Werte im Serum der infizierten Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion. Die gepunktete Linie entspricht dem Mittelwert an GPT in Kontrollmäusen, die mit NaCl infiziert worden sind. Jedes Symbol entspricht eine infizierte Maus. Schwarze Linien sind Mittelwerte der einzelnen Mausgruppen (n=5).

5.1.1.3 Nachweis einer primären Aktivierung von OVA-spezifischen T-Lymphozyten durch den Vakzineträger *Lm*

Nachdem die unterschiedlichen *Lm* $\Delta trpS$ Trägerstämme für Ovalbumin *in vitro* charakterisiert worden sind, stellte sich anschließend die Frage, ob Listerien durch die OVA-Freisetzung eine primäre Aktivierung von Lymphozyten („Priming“) ermöglichen. Ein „Priming“ kennzeichnet sich durch eine Präsentation der prozessierten Antigene über die Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse I und II (MHC-Klasse-I und II) der antigenpräsentierenden Zellen mit nachfolgender Erkennung durch spezifische T-Lymphozyten und deren anschließender Expansion aus [141]. Dies kann mit hoher Sensitivität und schneller als bei einem "echten" Priming durch den adoptiven Transfer von naiven T-Zellrezeptor (TCR)–transgenen T-Lymphozyten bestimmt werden [227, 259]. Diese TCR-transgenen T-Lymphozyten, die einen T-Zellrezeptor von bekannter Peptid/MHC-Spezifität exprimieren, werden in normale syngene Rezipientenmäuse („adoptiv“) transferiert, welche anschließend mit dem entsprechenden Antigen immunisiert werden. Anschließend kann durch die Anfärbung von spezifischen Oberflächenantigenen oder der Verwendung von MHC-

Tetrameren der prozentuale Anteil an transferierten T-Zellen vor bzw. nach Aktivierung und Expansion durchflußzytometrisch ermittelt werden.

In den hier durchgeführten adoptiven Transferexperimenten wurden CD8 T-Zellen von transgenen OT-I und CD4 T-Zellen von transgenen OT-II Mäusen verwendet. Die CD8 T-Zellen exprimieren einen TCR, welcher das Ovalbuminpeptid 257-264 (SIINFEKL) komplexiert an MHC-Klasse-I Molekül H-2K^b erkennt. Die hier verwendeten CD4 T-Zellen exprimieren dagegen einen TCR, welcher das Ovalbuminepitop 323-339 in Assoziation des MHC-Klasse-II Moleküls I-A^b erkennt. Durch Vorversuche (nicht gezeigt) wurde die Anzahl von 1×10^7 Milzzellen aus den transgenen Mäusen für den adoptiven Transfer ermittelt sowie der Tag der Infektion mit Listerien (ein Tag nach adoptivem Transfer), durch die eine signifikante Messung der Expansion von OVA-spezifischen T-Zellen ermöglicht wird. Für jeden einzelnen adoptiven Transferversuch wurden nur einwandfrei typisierte transgene OT-I und OT-II Mäuse eingesetzt. Auch sämtliche Bakterienstämme wurden für jeden *in vivo* Versuch nochmals per PCR überprüft. Des Weiteren wurde die ermittelte optimale Dosis von 5×10^7 an autolysierenden Trägerstämmen in den adoptiven Transferexperimenten verwendet.

5.1.1.3.1 Primäre Aktivierung von OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Für die Fragestellung, ob Listerien als Überträger von Ovalbumin eine primäre Aktivierung von spezifischen CD8⁺ T-Zellen ermöglichen, wurde die Häufigkeit an transferierten transgenen OT-I Zellen nach Immunisierung durch die jeweiligen *Lm* Trägerstämmen bestimmt.

Dafür wurden Milzen aus den transgenen OT-I Mäusen steril isoliert und Einzelzellsuspensionen hergestellt (→ 4.5.3). Anschließend wurden 1×10^7 Milzzellen in normale syngene C57BL/6 Rezipientenmäuse nach Protokoll (→ 4.5.4) injiziert. Am darauf folgenden Tag wurden jeweils drei Rezipientenmäuse pro Gruppe mit 5×10^7 Listerien, die OVA als Protein, als plasmidkodierte DNA oder mRNA übertragen, *i.v.* infiziert. Drei Tage später wurden die Mäuse getötet und die Milzen und Lebern entnommen. Aus den Milzen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und aus den Lebern wurden Homogenisate produziert, die anschließend mit Ultraschall behandelt wurden. Schließlich wurde die Bakterienanzahl durch geeignete Verdünnungsstufen in den Leberlysaten bestimmt, um festzustellen, ob ein Abtöten der infizierten Zellen durch OVA-spezifischen OT-I Zellen eintritt [17, 164]. Die Häufigkeit an proliferierenden OT-I Zellen in den Milzsuspensionen wurde unter der Verwendung der Antikörper anti-CD8/FITC, anti-CD44/PE-Cy5 und dem Tetramer H-2K^b-SIINFEKL/PE durchflußzytometrisch bestimmt (→ 4.5.5).

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass der neu konstruierte Stamm *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$ eine effiziente Proliferation von OT-I Zellen auslöste (Abb.: 5.21, A, gelber Balken).

Diese OT-I Zellen exprimierten auch vermehrt das CD44 Oberflächenantigen (gehört zur Familie der transmembranen Glycoproteinen), ein früherer Marker für die T-Zellaktivierung [61]. Damit hatten sich die transferierten Zellen nicht nur nach Erkennung des Komplexes aus MHC-Klasse-I und Ovalbuminpeptid 257-264 vermehrt, sondern wurden auch aktiviert. Des Weiteren zeigten die Daten, dass der DNA-übertragende Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}OVA$ kein „Priming“ von OT-I Zellen ermöglichte (Abb.: 5.21, A, roter Balken) wohingegen der Protein-übertragende Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$ sehr effizient eine Proliferation von OT-I Zellen auslöste. 33% aktivierte

und proliferierte OT-I Zellen in allen $CD8^+$ T-Zellen waren durchflußzytometrisch nachweisbar (Abb.: 5.21, A, grüner Balken).

Die einzigen Mäuse, die signifikant niedrige Anzahlen an Bakterien 3 Tage nach Infektion aufwiesen, waren diejenigen, welche mit dem Protein-übertragenden Stamm *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-PS_{actA}OVA infiziert wurden. Die beiden anderen Mausgruppen, welche mit dem DNA- und RNA-übertragenden Stämmen infiziert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede in den bakteriellen Anzahlen in den Lebern im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen (Abb. 5.21, B).

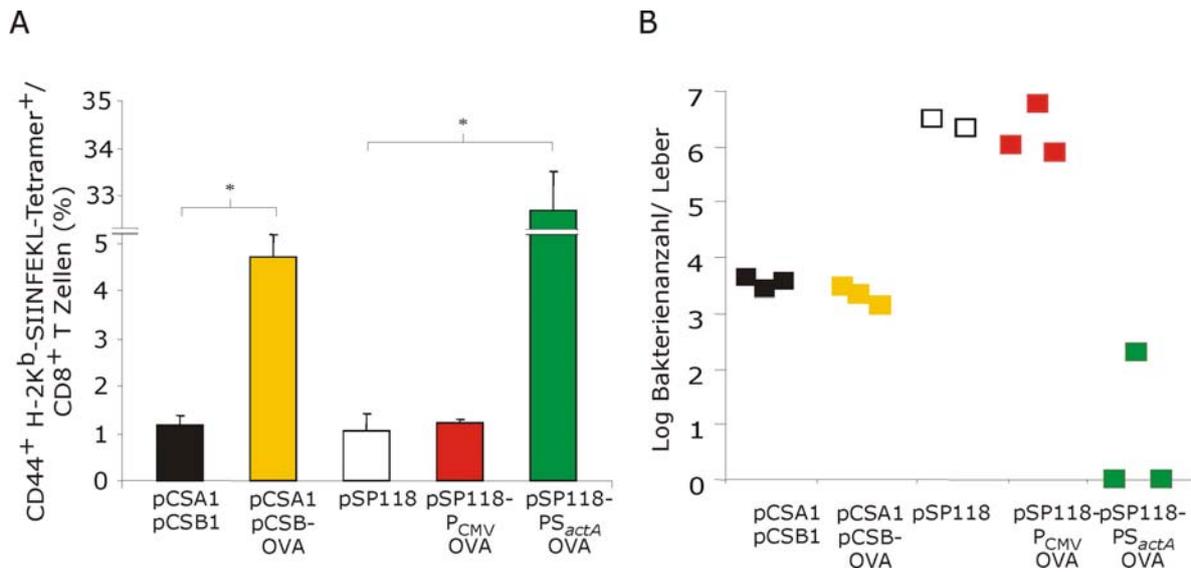


Abb. 5.21: (A) Klonale Expansion der transgenen $CD8^+$ T-Zellen nach Infektion mit *Lm* $\Delta trpS$ Stämmen, welche die verschiedenen OVA-Expressionsplasmide übertrugen. Einen Tag vor Infektion wurden 10^7 Milzzellen aus OT-I Mäusen in C57BL/6 Mäuse transfertiert. Drei Tage nach Infektion wurde die Häufigkeit an $CD44^+$ und $H-2K^b$:SIINFEKL Tetramer⁺ Zellen unter allen $CD8^+$ T-Zellen bestimmt, um eine MHC-Klasse-I-restringierte OVA Präsentation nachzuweisen. *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB1 und *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118 sind Kontrollstämmen. Die Stämme *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB-OVA, *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-P_{CMV}OVA, und *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-PS_{actA}OVA übertrugen Ovalbumin als plasmidkodierte mRNA, DNA oder als Protein. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen (n=3) und repräsentieren ein Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen. Sternchen weisen auf signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe (p<0,05, zweiseitiger stud. T-TEST). (B) Bakterienzahl in Lebern von infizierten Mäusen am Tag 3 nach Infektion. Ein farbiges Kästchen repräsentiert eine Maus pro Gruppe.

Anschließend wurden adoptive Transferexperimente durchgeführt, in denen 1-4 Log niedrigere oder auch 1 Log höhere Infektionsdosen als 5×10^7 der Vakzinierungsstämmen in die Rezipientenmäuse appliziert wurden. Mit diesen Versuchsansätzen sollte nachgewiesen werden, ab welcher Dosis ein „Priming“ stattfindet und ob durch eine größere Infektionsdosis auch eine höhere Aktivierung der OVA-spezifischen $CD8^+$ T-Lymphozyten möglich ist.

Die Ergebnisse in Abb 5.22 zeigen auf, dass 5×10^7 die Applikationsdosis der *Lm* Stämme für Freisetzung von OVA als Protein, als plasmidkodierte DNA oder mRNA darstellt, um am effizientesten eine Präsentation der Ovalbuminpeptide 257-264 über MHC-Klasse-I Moleküle mit nachfolgender Erkennung und Expansion der transfertierten OVA-spezifischen T-Lymphozyten zu bewirken. Ferner fällt auf, dass je mehr Protein-exprimierende Listerien in die Maus appliziert wurden, desto höher

die klonale Expansion an OT-I CD8 T-Zellen. Diese Dosisabhängigkeit konnte aber nach Applikation der Stämme *Lm* $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}OVA$, welche die DNA freisetzen nicht oder teilweise nur sehr gering nach Applikation der RNA-übertragenden Stämme *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$ gezeigt werden.

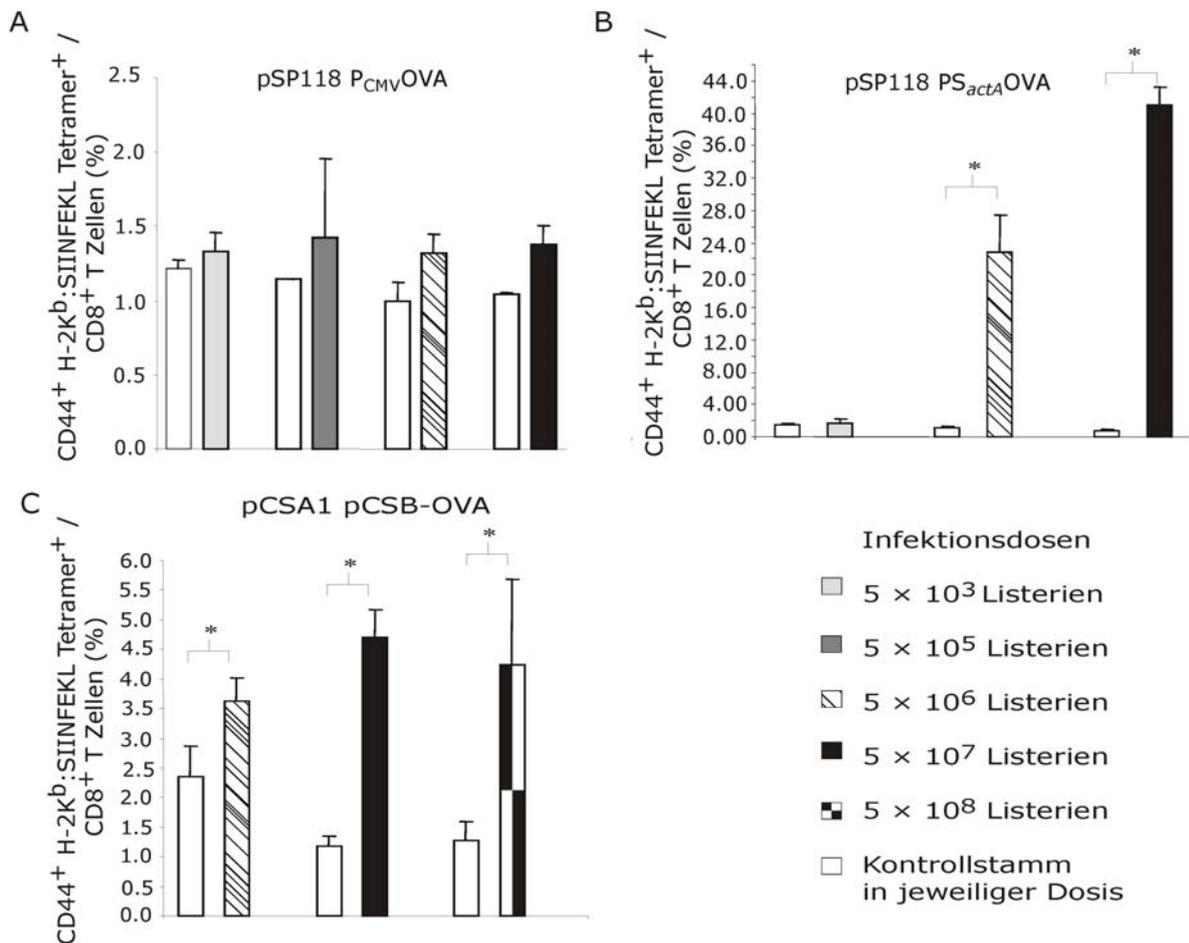


Abb. 5.22: Klonale Expansion an transferierten OT-I Zellen nach Applikation fünf unterschiedlicher Infektionsdosen der Stämme *Lm* $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}OVA$ (A), *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$ (B) und *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$ (C). Ergebnisse stellen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen dar (n=3). Sternchen weisen auf signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe (p<0,05, zweiseitiger stud. T-TEST).

Für die Untermauerung der Hypothese, dass die vorhandene *ply118*-vermittelte Autolysis des Protein-übertragenden Stammes nicht zu einem zusätzlichem Export der bakterieller Proteine über die Zellwand führte, wurden weitere adoptiven Transferexperimente mit autolysierenden im Vergleich zu nicht-autolysierenden Protein-übertragenden-Stämmen durchgeführt. In diesen wurde festgestellt, dass in Mäusen, die 5×10^3 ($0.5 \times LD_{50}$) nicht-autolysierende, OVA-exportierende *Lm* $\Delta trpS/pSP0-PS_{actA}OVA$ appliziert bekommen hatten, nur ca. 1 % aktivierte, proliferierende OT-I Zellen aufzufinden waren (Abb.: 5.23, A). Dagegen zeigte die Mausgruppe, die mit autolysierenden, OVA-exportierenden *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$ mit der gleichen Infektionsdosis von 5×10^3 infiziert wurden, keine signifikante Aktivierung und Proliferation von OT-I Zellen. Die Verabreichung von 5×10^7 autolysierenden Bakterien erwies sich dagegen auch in diesem

Versuchsansatz als die effizienteste (45.5 % Häufigkeit der OVA-spezifischer Zellen /CD8+ T-Zellen), um eine Präsentation der Ovalbuminpeptide 257-264 über MHC-Klasse-I Moleküle zu bewirken (Abb. 5.23, A, dunkelgrüner Balken).

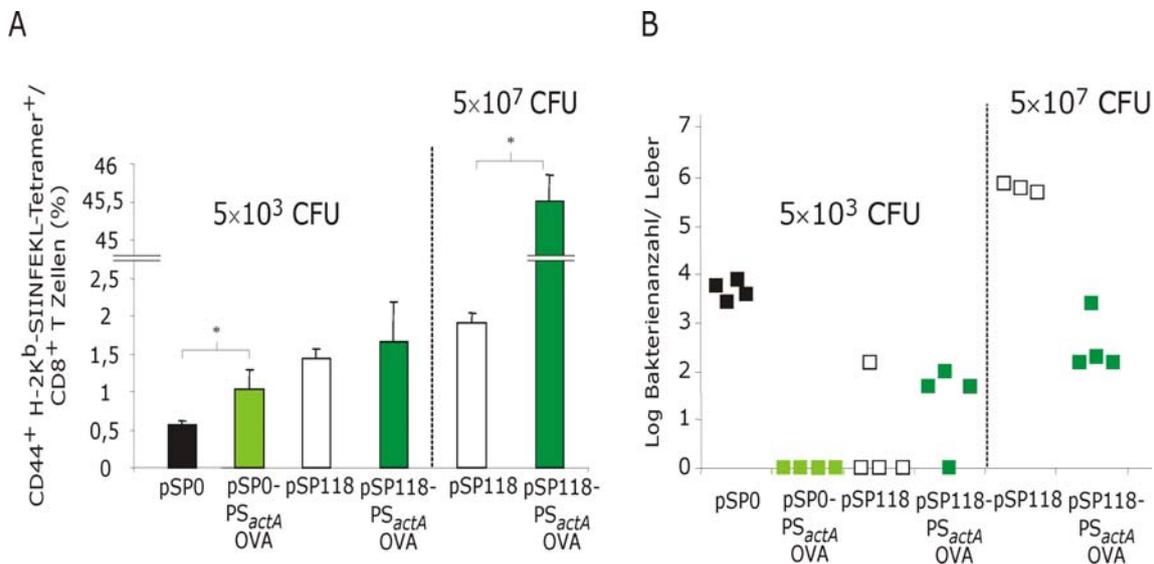


Abb. 5.23: Proliferation und Aktivierung der transferierten OT-I Zellen (A) und Bakterienzahlen in den Lebern (B) drei Tage nach Infektion mit den Protein-übertragenden Stämmen. Zum Vergleich wurden nicht-autolysierende und autolysierende *Lm ΔtrpS* Protein-übertragende Stämme in derselben Infektionsdosis (5×10³ CFU) appliziert und weiterhin wurde der autolysierende Stamm in einer höheren Dosis (5×10⁷ CFU) verabreicht. Ergebnisse stellen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen dar. Die Sternchen weisen auf signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe (p<0,05, zweiseitiger stud. T-TEST). Kästchen weisen auf Bakterienzahlen in der Leber einer infizierten Maus.

Neben der Bestimmung der Häufigkeit an proliferierenden und aktivierenden OT-I Zellen wurde auch gleichzeitig die bakterielle Anzahl in den Lebern durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt (Abb.: 5.23, B). Der nicht-autolysierende OVA-exportierende Stamm *Lm ΔtrpS/pSP0-PS_{actA}OVA* war in geringerer Anzahl in den infizierten Lebern zu finden, als der dazugehörige Kontrollstamm *Lm ΔtrpS/pSP0*. Auch der autolysierende, OVA-exportierende Stamm *Lm ΔtrpS/pSP118-PS_{actA}OVA*, welcher in einer höheren Dosis (5×10⁷ CFU) *i.v.* appliziert wurde, war in geringeren Anzahlen in den infizierten Lebern zu finden als sein Kontrollstamm *Lm ΔtrpS/pSP118*. Dagegen wurden mehr autolysierende, OVA-exportierende *Lm ΔtrpS/pSP118-PS_{actA}OVA* Stämme als der entsprechende Kontrollstamm *Lm ΔtrpS/pSP118* in den Lebern der Mäuse gefunden, welche mit einer geringeren Dosis (5×10³ CFU) dieser Stämme *i.v.* infiziert worden sind.

In vitro Versuche, die in Kooperation von S. Pilgrim durchgeführt wurden, bestätigen die ermittelten *in vivo* Ergebnisse der Ovalbumin Präsentation über MHC-Klasse-I Moleküle, ermöglicht durch die listerielle Übertragung von Ovalbumin als Protein als plasmidkodierte DNA oder mRNA. In diesen *in vitro* Versuchen wurden GM-CSF behandelte dendritische Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen (BMDC) mit den „Delivery“-Stämmen für 24 h infiziert und anschließend mit OT-I Zellen für 6h kultiviert. Schließlich wurde die Häufigkeit an IFN-γ-sezernierenden OT-I Zellen mit den Antikörpern anti-Vα2 TCR/FITC, anti-IFN-γ/PE und anti-CD8a/Cy-chrome™ durchfluß-

zytometrisch bestimmt. BMDCs, welche mit dem Stamm *Lm ΔtrpS/pSP118-PS_{actA}OVA*, der das OVA exportierte, infiziert worden waren, präsentierten scheinbar das Ovalbuminpeptid 257-264 und stimulierten damit die OT-I Zellen, da 25.5 % der OT-I Zellen IFN- γ sezernierten (Abb.: 5.24). Dagegen aktivierten die BMDCs, die mit Listerien infiziert wurden, welche die OVA-mRNA (*Lm ΔtrpS/pCSA1+pCSB-OVA*) übertrugen, nur eine kleine Menge an OT-I Zellen (1-2 %). Auch die Übertragung der plasmidkodierte DNA durch Listerien (*Lm ΔtrpS/pSP118-P_{CMV}OVA*) in BMDCs erzielte eine signifikante Aktivierung über MHC-Klasse-I-Moleküle, folglich auch eine signifikant Anzahl an IFN- γ -sezernierenden OT-I Zellen.

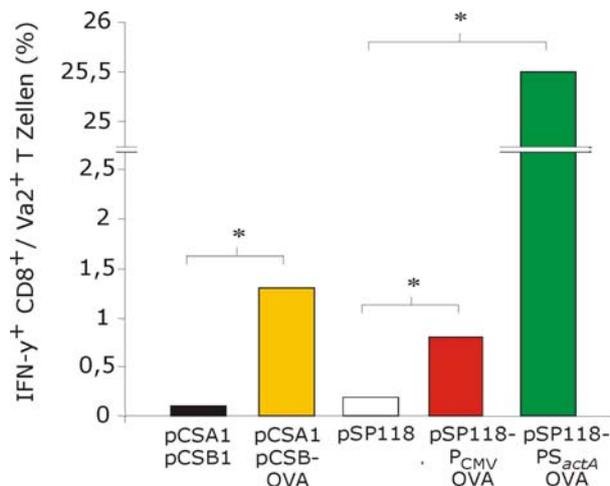


Abb. 5.24: Durchflußzytometrische Bestimmung der Häufigkeit an IFN- γ -sezernierenden OT-I Zellen nach Stimulation durch infizierte DCs mit den drei autolysierenden *Lm ΔtrpS* „Delivery“-Stämmen und den entsprechenden Kontrollstämmen. DCs wurden 24 h lang mit einer MOI von 1 mit *Lm ΔtrpS/pSP118-PS_{actA}OVA*, *Lm ΔtrpS/pSP118-P_{CMV}OVA*, *Lm ΔtrpS/pCSA1+pCSB-OVA*, *Lm ΔtrpS/pSP118* und *Lm ΔtrpS/pCSA1+pCSB1* infiziert und anschließend für 6 h mit OT-I Zellen inkubiert. Sternchen stellen signifikante Ergebnisse (zweiseitiger stud. T-Test, $p < 0,05$) zwischen den Proben und ihren Kontrollen dar.

5.1.1.3.2 Primäre Aktivierung von OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

Nachdem eine primäre Aktivierung von OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch Immunisierung mit den Stämmen für die drei unterschiedlichen „Delivery“-Strategien nachgewiesen worden ist, sollte in nachfolgenden Experimenten auch die primäre Aktivierung von spezifischen CD4⁺ T-Zellen untersucht werden.

Hierfür wurden 1×10^7 Milzzellen aus transgenen OT-II Mäusen in syngene C57BL/6 Mäuse übertragen und 24 h später wurden diese mit 5×10^7 CFU der drei *Lm ΔtrpS* Trägerbakterien für OVA als Protein, als plasmidkodierte DNA oder mRNA und der zwei Kontrollstämmen infiziert. Drei Tage nach Infektion wurde die Anzahl an transferierten OT-II Zellen durch Markierung spezifischer Oberflächenantigene unter Verwendung der Antikörper anti-CD4/Cy-Chrome, anti- Va2 TCR /FITC und anti- V β 5.1, 5.2 TCR /PE durchflußzytometrisch bestimmt (\rightarrow 4.5.5).

Eine Präsentation des Ovalbuminepitops 257-264 über MHC-Klasse-II Moleküle und damit eine Proliferation der OT-II CD4⁺ T-Zellen auf 9,5 % der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation war nur mit dem Protein-übertragenden Stamm *Lm ΔtrpS/pSP118-PS_{actA}OVA* möglich. Die beiden anderen Mausgruppen, welche mit Stämmen für Ovalbumin als plasmidkodierte DNA (*Lm ΔtrpS/pSP118-P_{CMV}OVA*) oder mRNA (*Lm ΔtrpS/pCSA1+pCSB-OVA*) infiziert worden sind, zeigten keine OT-II Proliferation und somit keine CD4⁺ T-Zellaktivierung (Abb.: 5.25, A).

Des Weiteren zeigten nur die Leberhomogenisate der infizierten Mäuse, welche mit dem Protein-übertragenden Stamm *ΔtrpS/pSP118-PS_{actA}OVA* infiziert wurden, eine signifikante Reduktion (2.5 Log) in der Bakterienzahl im Vergleich zu den Bakterienzahlen in den Lebern der Kontrollmäuse (infiziert mit *Lm ΔtrpS/pSP118*). Mäuse, welche mit den Stämmen *Lm ΔtrpS/pSP118-P_{CMV}OVA* und

Lm $\Delta trpS$ /pCSA+pCSB-OVA, die OVA als plasmidkodierte DNA oder RNA freisetzen, infiziert wurden, zeigten in ihren Lebern sogar eine höhere Anzahl an Listerien auf, als die Listerienzahlen in den Lebern der entsprechenden Kontrollmäuse (infiziert mit *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA+pCSB1) (Abb.: 5.25, B).

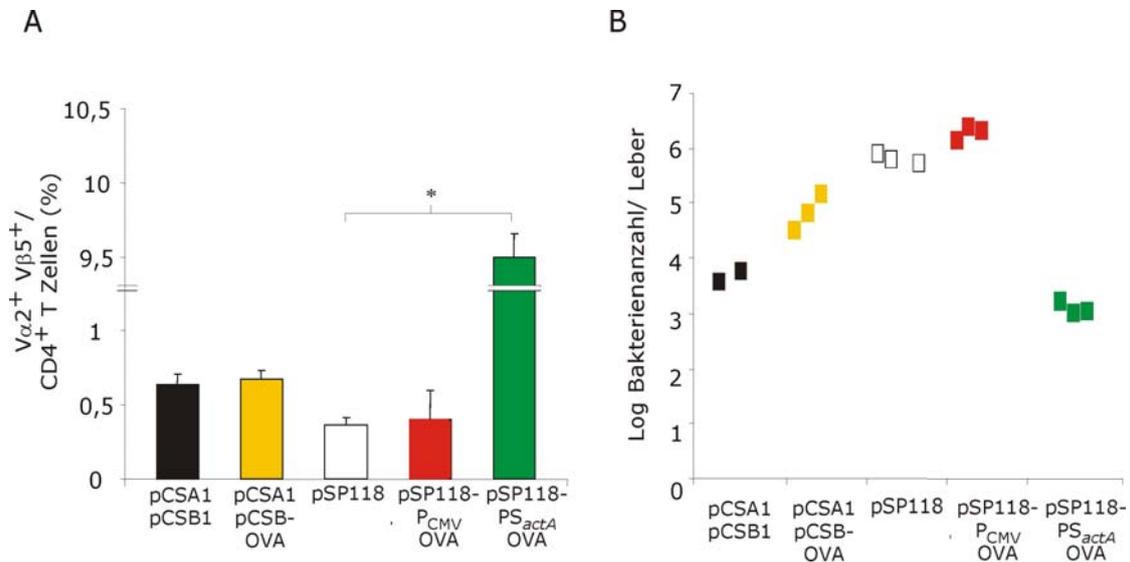


Abb. 5.25: (A) Klonale Expansion von transferten OT-II Zellen nach *i.v.* Infektion mit den Stämmen für Ovalbumin als Protein (*Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-PS_{actA}OVA), als plasmidkodierte DNA (*Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-P_{CMV}OVA) oder als mRNA (*Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB-OVA). Ergebnisse entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen (n=3). *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB1 und *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118 sind die entsprechenden Kontrollstämme. (B) Anzahl an „Delivery“-Stämmen in Lebern der infizierten C57BL/6 Mäuse am Tag 3 nach *i.v.* Infektion innerhalb eines adoptiven Transferexperimentes. Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Sternchen geben signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe an (zweiseitiger stud. T-Test, p<0,05). Kästchen weisen auf Bakterienanzahlen in der Leber einer infizierten Maus.

5.1.1.4 *In vivo* Versuche zum Nachweis einer T-Gedächtniszellantwort nach Immunisierung durch die drei Trägerstämme

In dem vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass eine einmalig-gegebene Infektionsdosis der Stämme *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-PS_{actA}OVA und *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB-OVA die Übertragung von Ovalbumin als Protein und mRNA in antigenpräsentierende Zellen ermöglichte. Weiterhin erlaubte diese OVA-Protein- und OVA-mRNA-Freisetzung in das Zytosol der APZs eine signifikante Präsentation der Ovalbuminpeptide 257-264 (SIINFEKL) über MHC-Klasse-I-Moleküle und die damit verbundene Aktivierung und Proliferation von transferten OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Abb. 5.21). Ebenso induzierte die Freisetzung des OVA-Proteins durch den Stamm *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-PS_{actA}OVA die Präsentation der Ovalbuminpeptide 323-339 in Assoziation des MHC-Klasse-II-Moleküls und damit die klonale Expansion von transferten CD4 T-Zellen (Abb. 5.25). Deshalb wurde anschließend eine Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit diesen *Lm* Stämmen durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob durch die Freisetzung von Ovalbumin als Protein, als plasmidkodierte DNA oder mRNA mittels der respektiven *Lm* $\Delta trpS$ Stämme OVA-spezifische T-Gedächtniszellen nach mehreren wiederholten *i.v.* Applikationen induziert werden können.

Dafür wurden Mausgruppen zu je 5 Mäusen mit 5×10^7 CFU der jeweiligen Trägerstämmen *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-PS_{actA}OVA, *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-PCMV OVA, *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB-OVA und den entsprechenden Kontrollstämmen in 3-wöchigen Intervallen dreimal *i.v.* infiziert. Naïve Mäuse erhielten eine Injektion von isotonischer Kochsalzlösung. Die Immunantwort der OVA-spezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten wurde anschließend auf Einzelzellebene durch einen IFN- γ -ELISPOT-Assay quantifiziert (\rightarrow 4.5.6.3.2). Dafür wurden die Mäuse am Tag 49 *p. I.* getötet und deren Milzen entnommen und für ELIPOT-Assays aufgearbeitet (\rightarrow 4.5.6). Dabei wurde die Häufigkeit an IFN- γ -sezernierenden OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen als Anzahl von IFN- γ -Spots bestimmt, die bei der Stimulation von 1×10^5 separierten Lymphozyten durch das Ovalbuminpeptid SIINFEKL innerhalb von 24 h entstanden. Die Häufigkeit an IFN- γ -sezernierenden OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde durch die 24 h-Stimulation von 4×10^5 Milzzellen mit dem nativen Ovalbumin Protein bestimmt. Gleichzeitig wurden auch Mediumkontrollen, d. h. Zellen ohne Stimulation mit ausgewertet.

Mäuse, welche mit OVA-exportierenden *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-PS_{actA}OVA infiziert wurden, wiesen 448 IFN- γ -sezernierende CD8⁺ pro 1×10^5 Lymphozyten und 249 IFN- γ -sezernierende CD4⁺ T-Zellen pro 4×10^5 Milzzellen auf (Abb. 5.26, A u. B, grüner Balken). Der Stamm *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB-OVA, der die OVA-mRNA übertrug, war dagegen nur erfolgreich im Induzieren einer spezifischen CD8⁺ T Zellantwort (Abb. 5.26, A, gelber Balken).

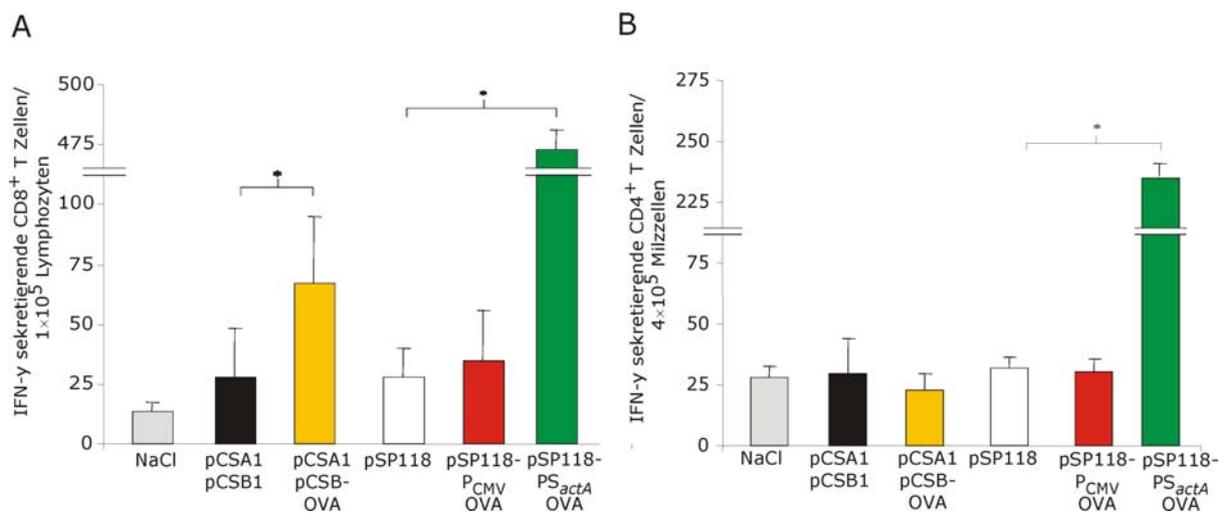


Abb. 5.26: OVA-spezifische T-Zellantworten von C57BL/6 Mäusen, welche mit 5×10^7 CFU der drei autolysierenden Trägerstämmen in 3-wöchigen Intervallen dreimal *i.v.* infiziert wurden. Milzzellen wurden am Tag 49 für eine ELISPOT-Auswertung geerntet. Kontrollmäuse erhielten eine Injektion von isotonischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) oder wurden mit den Kontrollstämmen *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB1 und *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118 infiziert. (A) CD8⁺ T-Zellantworten. Es wurden 1×10^5 Lymphozyten aus den Milzen separiert und im Dreifachansatz mit dem Ovalbuminpeptid SIINFEKL inkubiert um IFN- γ -sezernierende CD8⁺ T-Zellen zu erhalten. (B) CD4⁺ T-Zellantworten. Die Häufigkeit an IFN- γ -sezernierenden CD4⁺ T-Zellen wurde im Dreisatz durch die Behandlung von 4×10^5 Milzzellen mit dem nativen Ovalbumin Protein erhalten. Unstimulierte Zellen (Mediumkontrollen) hatten eine gleichmäßige niedrige IFN- γ -Antwort. Dieser Hintergrund wurde deshalb nicht von den stimulierten Zellen abgezogen und ist auch nicht gezeigt. Ergebnisse stammen aus einem repräsentativen Versuch von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten und stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus einer Gruppe von 5 Mäusen dar. Sternchen symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen Proben und Kontrollen (zweiseitiger stud. T-TEST, $p < 0,05$).

Die Mäuse, welche mit diesem RNA-übertragenden Stamm infiziert wurden, wiesen sehr viel niedrigere Frequenzen an IFN- γ -sezernierenden CD8⁺ T-Zellen (68 Zellen) auf als der Stamm, der OVA-Proteine exportierte. In Übereinstimmung zu den vorherigen Ergebnissen, zeigte der Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}OVA$, der die plasmidkodierte OVA-DNA übertrug, keine Induktion von OVA-spezifischen CD8⁺ oder CD4⁺ T-Gedächtniszellen (Abb. 5.26, A u. B, roter Balken).

Außerdem wurden 7 Tage nach der letzten Immunisierung die Mäuse nicht nur nach Anwesenheit von OVA-spezifischen T-Gedächtniszellen untersucht, sondern auch nach Anwesenheit von IgG-Antikörpern, welche gegen OVA gerichtet sind. Dabei sollten alle Tiere, welche mit den OVA-übertragenden Listerien immunisiert worden sind, anti-OVA IgG Antikörper im Serum aufweisen, während bei den Mäusen, welche mit den Kontroll-Listerien infiziert wurden, keine anti-OVA Antikörper erwartet wurden. Die Anwesenheit von OVA-spezifischen IgG-Antikörpern sind erste Hinweise für die Aktivierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und die damit verbundene Aktivierung einer humoralen Immunantwort [141].

Dafür wurde Blut aus den Herzen aller infizierten und nicht infizierten Mäuse gewonnen. Anschließend wurde aus diesen einzelnen Blutproben die Seren durch Zentrifugation isoliert und diese im ELISA (\rightarrow 4.5.6.3.1) auf Gesamt-IgG analysiert. Als Antigenbeschichtung im ELISA wurde Ovalbumin verwendet.

Im Gegensatz zur Positiv-Kontrolle, einem Serum, welches IgG Antikörper gegen OVA aufweist, wurde in keinem naiven als auch in keinem immunisierten bzw. „geboosterten“ Tier OVA-spezifische IgG Antikörper nachgewiesen. Die Infektion mit OVA-Protein-, mit OVA-DNA- oder OVA-mRNA-transferierenden Listerien erzeugte folglich keine humorale Immunantwort gegen dieses Antigen im C57BL/6-Hintergrund (Abb.: 5.27).

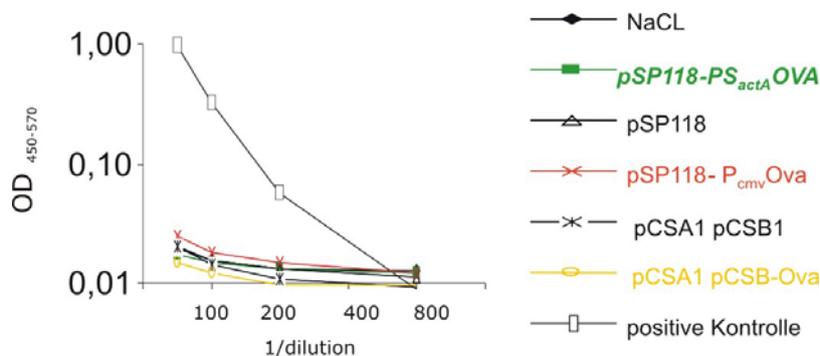


Abb. 5.27: Nachweis der Anwesenheit von Gesamt IgG-Antikörper gerichtet gegen Ovalbumin in Seren immunisierter C57BL/6 Mäuse mit den *Lm* OVA-Trägerstämmen durch ELISA-Analysen.

5.1.1.5. Effizienz weiterer virulenzattenuierter *Lm* Stämme als Überträger von Ovalbumin *in vivo*

Die bisher durchgeführten *in vivo* Ergebnisse zeigten auf, dass die PLY118 Expression bei intrazellulären Listerien zu einer erhöhten Virulenzattenuation in C57BL/6 Mäusen führte (Abb. 5.17). Deshalb konnten 5×10^7 Bakterien *i.v.* in C57BL/6 Mäuse appliziert werden, ohne dass Krankheitszeichen auftraten. Trotzdem wiesen die Lebern der infizierten Mäuse nach drei Tagen eine bakterielle Dichte von 10^7 auf. Zusätzlich wurden im Serum dieser infizierten Mäuse vor allem in den ersten drei Tagen der Infektion erhöhte Konzentrationen an Glutamat-Pyruvat-Transaminase

nachgewiesen, was auf eine Leberschädigung hinweist. Daraus folgte, das zusätzliche Virulenzattenuationen des Trägerstammes durch die Deletion von z. B. Virulenzgenen oder Genen, welche Komponenten des Stoffwechsels kodieren, notwendig sind.

5.1.1.5.1 Der Stamm *Lm ΔtrpS hlyW491A* als Überträger von Ovalbumin

Listeriolysin O (LLO) ist ein Hauptvirulenzfaktor der Listerien, der zuerst als essentieller Faktor für das Wachstum der Listerien in Leber und Milz identifiziert wurde. Listerien gelangen ins Zytoplasma der Wirtszelle, in dem sie LLO exportieren, welches als porenformendes Toxin die Phagosomenmembran zerstört [140]. Des Weiteren ist LLO ein Hauptantigen, gegen das eine schützende Immunität generiert wird [304]. *Lm* Stämme, bei denen LLO deletiert wurde und die deshalb nicht aus den Phagosomen entkommen, werden sehr schnell durch Mechanismen der angeborenen Immunität abgetötet ohne das eine adaptive Immunität induziert worden ist. LLO wurde außerdem als ein Molekül identifiziert, das für die Induktion der Apoptose in Wirtszellen, wie z. B. DC, verantwortlich ist [140].

Wegen diesen angesprochenen Charakteristiken war die Strategie, LLO nicht ganz zu deletieren, sondern eine Aminosäure (AS)-Substitution von Tryptophan nach Alanin an der AS-Stelle 491 in das LLO Protein einzuführen. Diese isogene Mutante *hlyW491A* exportiert eine LLO-Variante, welche immer noch Listerien dazu befähigt, aus dem Phagosom zu entkommen, aber eine sehr geringe zytotoxische Aktivität (10 %) im Vergleich zum wildtypischen LLO besitzt [170]. Demnach sollten die listeriellen zytotoxischen Effekte auch *in vivo* abgeschwächt sein, so dass die antigenpräsentierende Wirtszelle mehr Zeit nach Freisetzung des OVAs aus dem „DNA-Delivery“ Stamm bekommt, ein Priming von OVA-spezifischen CD8 T-Zellen *in vivo* zu ermöglichen. Mit Hilfe dieser *Lm* Mutante *hlyW491A* wurde schon von der Gruppe um S. Weiss ein effizienter *in vitro* Gentransfer des plasmidkodierten cystischen Fibrosingens CFTR in Wirtszellen aufgezeigt [170, 317].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die OVA-Expressionsplasmide und die dazugehörigen Kontrollplasmide in die Mutante *Lm ΔtrpS hlyW491A/pflotrpS*, die von Sabine Pilgrim hergestellt wurde, transformiert und gegen das ursprünglich enthaltene Plasmid *pflotrpS* nach Protokoll (→ 4.2.5) ausgetauscht. Anschließend wurden die erhaltenen Stämme *Lm ΔtrpS hlyW491A/pSP118-PS_{actA}OVA*, *Lm ΔtrpS hlyW491A/pSP118-P_{CMV}OVA*, *Lm ΔtrpS hlyW491A/pSP118*, *Lm ΔtrpS hlyW491A/pCSA1+pCSB1* und *Lm ΔtrpS hlyW491A/pCSA1+pCSB-OVA* in adoptiven Transferexperimenten eingesetzt, um eine primäre Aktivierung von MHC-Klasse-I-restringierten CD8⁺ T-Zellen nachzuweisen.

Dafür wurden C57BL/6 Rezipientenmäuse einen Tag nach dem adoptivem Transfer von 1×10^7 Milzellen aus OT-I Mäusen mit 5×10^7 CFU dieser *Lm* Stämmen infiziert. Drei Tage später wurde die Häufigkeit der transferierten OT-I Zellen unter der Verwendung der Antikörper anti-CD8/FITC, anti-CD44/PE-Cy5 und dem Tetramer H-2K^b-SIINFEKL/PE durchflußzytometrisch bestimmt. (→ 4.5.5). Zusätzlich wurden die Leberhomogenisate der infizierten Mäuse ausplattiert, um die Anzahl intrazellulärer Bakterien festzustellen.

Im Gegensatz zu den isogenen WT Stämmen *Lm ΔtrpS/pSP118-PS_{actA}OVA* und *Lm ΔtrpS/pCSA1+pCSB-OVA* induzierten die neuen Stämme *Lm ΔtrpS hlyW491A/pSP118-PS_{actA}OVA* und *Lm ΔtrpS hlyW491A/pCSA1+pCSB-OVA* eine 25 %-ige und 15 %-ige klonale Expansion der

transferierten OT-I Zellen (Abb.: 5.21, A). Jedoch diesmal ermöglichte auch der Stamm *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-P_{CMV}OVA, welcher OVA als plasmidkodierte DNA in C57BL/6 überträgt eine signifikante klonale Expansion von 1.81 % an aktivierten OT-I Zellen. Der Stamm *Lm* $\Delta trpS$ hlyW491A/pSP118-PS_{actA}OVA, der das OVA-Protein überträgt, zeigte dabei die beste Effizienz (24.5 % Häufigkeit an proliferierenden and aktivierten der OVA-spezifischer Zellen /CD8⁺ T-Zellen) um eine primäre Aktivierung der OT-I Zellen zu induzieren. Damit ist es dieser Doppelmutante *Lm* $\Delta trpS$ hlyW491A möglich, Ovalbumin als Protein als DNA oder mRNA in das Zytosol der Mäuse zu übertragen, so dass eine MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation ermöglicht wurde, welche von den OVA-spezifischen transferierten OT-I CD8⁺ T-Zellen erkannt worden ist (Abb.: 5.28, A). Eine deutlich niedrigere Anzahl an Listerien wurden nur in Lebern solcher Mäuse gefunden, welche mit dem Protein-übertragenden Stamm *Lm* $\Delta trpS$ hlyW491A/pSP118-PS_{actA}OVA infiziert wurden. Die anderen Mausgruppen zeigten vergleichbare Bakterienzahlen in ihren Lebern (Abb.: 5.28, B).

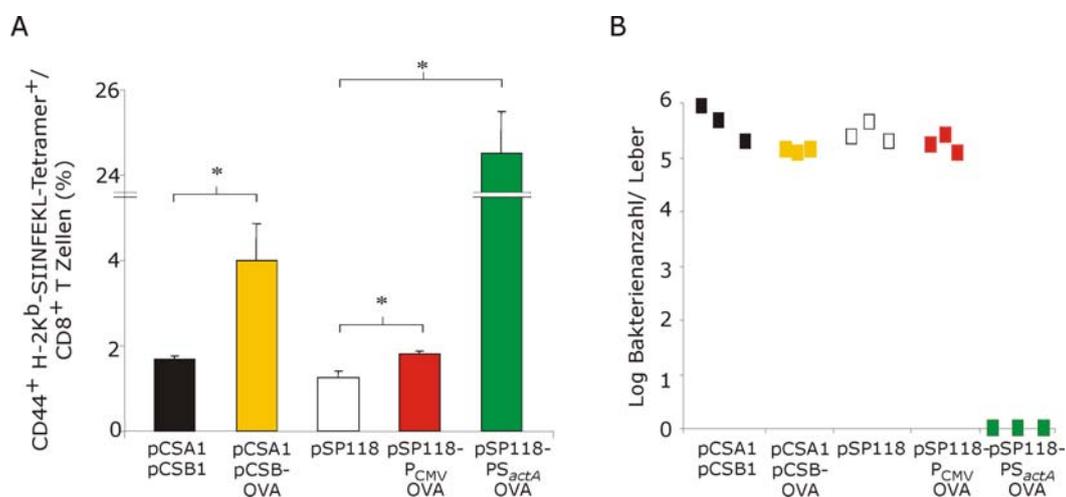


Abb. 5.28: (A) Klonale Expansion an transferierten OT-I Zellen nach *i.v.* Infektion von 5×10^7 der OVA-Trägerstämme *Lm* $\Delta trpS$ hly W491A/pSP118-PS_{actA}OVA, *Lm* $\Delta trpS$ hly W491A/pSP118-P_{CMV}OVA und *Lm* $\Delta trpS$ hly W491A/pCSA1+pCSB-OVA und deren Kontrollstämme. Ergebnisse entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen (n=3). (B) Anzahl an Bakterien 3 Tage nach Infektion und 4 Tage nach adoptiven Transfer von OT-I Zellen. Sternchen geben signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe an (zweiseitiger stud. T-Test, $p < 0,05$). Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

5.1.1.5.2 *Lm* $\Delta(trpS aroA aroB)$ als Überträger von Ovalbumin

Der Stamm *Lm* $\Delta(trpS aroA aroB)$ /pflotrpS, der zusätzliche Deletionen in wichtigen listeriellen Genen für die aromatische Aminosäuren-Biosynthese besitzt, sollte auch hinsichtlich der Übertragung von Ovalbumin als Protein, als plasmidkodierte DNA oder mRNA untersucht werden. Defekte in der Biosynthese aromatischer Aminosäuren führen fast immer [131, 289] zu einer Virulenzattenuation und deshalb werden solche Mutanten, die diese Defekte aufweisen, als Vakzineträger verwendet. Auch der isogene Stamm *Lm* $\Delta(trpS aroA)$ /pflotrpS WL-141, in dem das erste wichtige Enzym für die Biosynthese aromatischer AS deletiert wurde, wurde schon sehr erfolgreich als Überträger von Plasmid-DNA im Vergleich zum WT *Lm* $\Delta trpS$ in einigen Zelllinien eingesetzt [235]. Ebenso ist dieser aufgrund der defizienten oxidativen Respiration und der damit

verbundenen reduzierten Replikation und der langsameren interzellulären Ausbreitung, sehr stark virulenzattenuiert [289]. Des Weiteren ermöglichte diese *aroA*-Deletionsmutante die Ausbildung einer schützenden Immunität gegen den *Lm* WT, blieb aber trotzdem gleichzeitig hoch immunogen und scheint daher ein guter Kandidat als Träger heterologer Impfstoffe zu sein [289].

Durch zusätzliche Deletion eines weiteren Gens (*aroB*), welches das zweite Enzym des Reaktionsweges für die Biosynthese aromatischer AS kodiert, konnte die Mutante *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ konstruiert werden, die biologisch sicherer ist, da beide deletierten Gene *aroA* und *aroB* auf unterschiedlichen Genabschnitten im listeriellen Chromosom verteilt liegen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zuerst untersucht werden, ob dieser Stamm *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ /pflotrps durch die zusätzliche Ausstattung mit dem Autolysissystem (P_{actA} -*ply118*) eine höhere Virulenzattenuation als der autolysierende isogene WT Stamm *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118 erreicht. Dafür wurde die Deletionsmutante *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ /pflotrps mit dem Kontrollplasmid pSP118 transformiert. Anschließend wurde das ursprünglich vorhandene Plasmid pflotrps nach Protokoll mit dem Plasmid pSP118 ausgetauscht (\rightarrow 4.2.5). Schließlich wurden 25 C57BL/6 Mäuse (5 \times 5) mit 5×10^7 *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118 und 25 C57BL/6 Mäuse (5 \times 5) mit 5×10^7 *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ /pSP118 infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (4h, 1 Tag, 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage) wurden jeweils fünf Mäuse aus den beiden Gruppen getötet und die Bakterienzahl in Leber und Milz durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt. Vorher wurde Blut aus dem Herzen der Mäuse zur Bestimmung der Konzentration an GPT im Serum gewonnen.

Am Beginn der Infektion zeigte sich eine um 1 log niedrigere Anzahl der autolysierenden Listerien $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ /pSP118 in Leber und Milz im Vergleich zum autolysierenden WT Stamm *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118. Die Anzahl an diesen autolysierenden *aroAB*-Mutanten verringerte sich innerhalb des Infektionszeitraumes kontinuierlich, wobei ab Tag 3 die Anzahl der autolysierenden *aroAB*-Mutanten in den Lebern immer 2-3 log niedriger waren als die wildtypischen Bakterienzahlen (Abb.: 5.29, A).

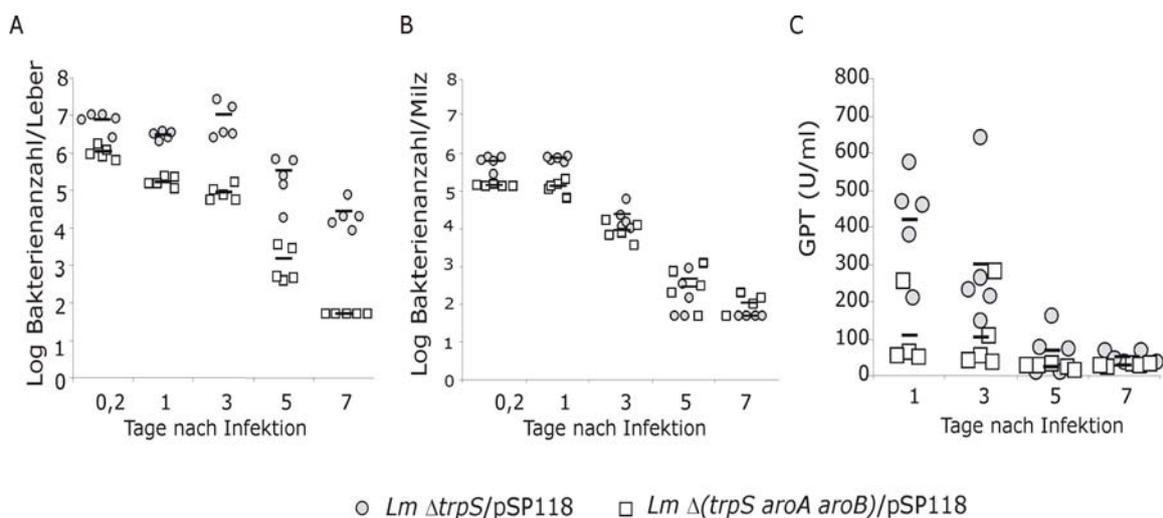


Abb. 5.29: Virulenzattenuation und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)-Werte des autolysierenden Stammes *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ /pSP118 im Vergleich zum isogenen autolysierenden WTs *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118. Bakterienzahl in Leber (A) und Milz (B) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit 5×10^7 Bakterien. (C) GPT-Werte im Serum der infizierten Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten. Jedes Symbol repräsentiert eine infizierte Maus und die schwarzen Linien zeigen Mittelwerte der Gruppen an (n=5). Ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängig durchgeführten Versuchen ist dargestellt.

Nachdem nun die erhöhte Virulenzattenuation dieses Stammes *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP118$ aufgezeigt wurde, sollte anschließend die Effizienz dieses Stammes zur Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten untersucht werden. Dafür wurden die OVA-Expressionsplasmide pSP118-PS_{actA}OVA, pSP118-P_{CMV}OVA, pCSA+pCSB-OVA und die Kontrollplasmide pCSA1+pCSB1 in die Deletionsmutante *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pflotrps$ transformiert. Die einzigen Stämme die schlecht kultivierbar waren, waren die Stämme die beide Plasmide für die „RNA-Delivery“-Strategie trugen. Der neue Stamm *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pCSA1+pCSB-OVA$ und der Kontrollstamm *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pCSA1+pCSB1$ wuchsen noch sehr langsam auf Agarplatten, doch in Flüssigmedium ließen sie sich nicht mehr kultivieren.

Deshalb wurde die Effizienz des Stammes *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ nur im Hinblick auf das „DNA-“ oder „Protein-Delivery“ im Vergleich zum isogenen WT Stamm *Lm* $\Delta trpS$ in C57BL/6 Mäusen ermittelt. Da eine höhere Virulenzattenuation dieses Stammes in C57BL/6 Mäusen vorlag, wurden in diesem Experiment 1×10^8 (anstelle von 5×10^7) Bakterien einen Tag nach adoptivem Transfer von 1×10^7 OT-I Zellen in C57BL/6 Mäuse *i.v.* appliziert.

Die Mäuse, welche mit *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP118-PS_{actA}OVA$ („Protein-Delivery“) infiziert worden waren, zeigten eine Häufigkeit von 48,75 % an aktivierten und proliferierenden OVA-spezifischen Zellen/ CD8⁺ T-Zellen. Der Stamm *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP118-P_{CMV}OVA$, der die OVA-plasmidkodierende DANN übertrug, zeigte dagegen wie sein isogener WT Stamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}OVA$ keine signifikante Induktion einer Proliferation der transferierten OT-I Zellen im Vergleich zum Kontrollstamm *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP118$ (Abb.: 5.30, A). Insgesamt wurden ähnliche Werte an proliferierenden CD8⁺ T-Zellen mit diesem neuen Stamm *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ im Vergleich zum WT Stamm *Lm* $\Delta trpS$ erhalten (\rightarrow 5.1.1.3.1).

Die Bakterienzahlen in den Lebern der C57BL/6 Rezipientenmäuse, welche mit dem Stamm *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP118-PS_{actA}OVA$ infiziert wurden, war 2-3 Log niedriger als die Bakterienzahlen in Lebern der Kontrollmäuse oder der Mäuse, welche mit *Lm* $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}OVA$ infiziert wurden. Die Mäuse, welche mit dem DNA-übertragenden Stamm infiziert wurden, zeigten ähnliche Werte an Bakterien in ihren Lebern, bis auf eine Maus, die eine deutlich niedrigere bakterielle Belastung in der Leber hatte (Abb.: 5.30, B).

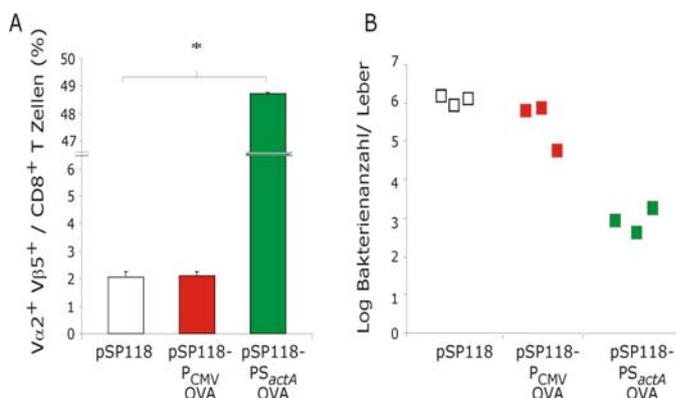


Abb. 5.30: Proliferation von OVA-spezifischen transferierten CD8⁺ T-Zellen und Bakterienzahlen in Lebern nach Infektion durch 1×10^8 autolysierende *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ Stämme, welche die OVA-Expressionsplasmide fürs „DNA-Delivery“ (pSP118-P_{CMV}OVA) oder fürs Protein-Delivery (pSP118-PS_{actA}OVA) tragen. Einen Tag vor der Infektion wurden 1×10^7 OT-I Zellen in die C57BL/6 Rezipientenmäuse transferiert. (A)

Die Häufigkeit von Vα2⁺ und Vβ5⁺ unter allen CD8⁺ T-Zellen wurden drei Tage nach Infektion durchflußzytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen (n=3). (B) Bakterienzahlen der *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ „Delivery“-Stämme in den Lebern drei Tage nach Infektion und vier Tage nach adoptiven OT-I Transfer. Jedes Sympol repräsentiert die bakterielle Ladung in der Leber einer Maus. Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Sternchen geben signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe an (zweiseitig stud. T-Test, p<0,05).

5.1.2 IE1 des murinen Zytomegalievirus als Modellantigen

Nachdem mit Hilfe des Modellantigens Ovalbumin gezeigt wurde, dass die drei Vakzinierungsstrategien unter Verwendung der autolysierenden, virulenzattenuierten *Lm ΔtrpS* Trägerstämme erfolgreich eine primäre T-Lymphozyten Aktivierung und eine adaptive Immunität mit OVA-spezifischen T-Gedächtniszellen generiert hatten, sollte ein weiteres Modellantigen aus dem murinen Zytomegalievirus (mCMV) in die vorhandenen Strategien kloniert werden. Anschließend sollte in nachfolgenden Protektionsexperimenten mit dem Krankheitserreger mCMV nachgewiesen werden, ob diese autolysierenden virulenzattenuierten *Lm* Stämme durch die Übertragung des mCMV-Antigens als exportiertes Protein, als plasmidkodierte DNA oder mRNA einen wirklichen Impferfolg, also den Schutz gegen den Krankheitserreger mCMV, erzielen können. Das „immediate-early“ Protein IE1 des mCMV wurde als zweites Modellantigen für diese Arbeit ausgewählt. Dieses 89 kD schwere Protein (auch PP89 genannt) ist das Hauptprotein von mehreren frühen exprimierten Proteinen, welche von sogenannten „immediate-early“ Genen als erstes nach der Infektion von Wirtszellen exprimiert werden. IE-Genprodukte regulieren die Expression von weiteren viralen dominanten Genen und gleichzeitig dienen sie dem Immunsystem des Wirtes als Hauptantigene [159, 160]. CD8⁺ T-Lymphozyten, welche IE-Genprodukt-Spezifitäten aufweisen, repräsentieren eine dominante Fraktion (80 %) der antigen-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten im akuten Infektionsverlauf [159, 213].

Damit spielt die zellvermittelte Antwort gegen das mCMV eine entscheidende Rolle, um eine akute Infektion zu beenden oder die Reaktivität und Verbreitung des latenten Virus zu unterbinden [213]. Genau solche spezifischen zytotoxischen T-Zellen wurden schon im Rahmen der Versuche mit dem Modellantigen Ovalbumin durch die verwendeten *Lm ΔtrpS* Impfstoffträger stimuliert.

Die Protektionsexperimente konnten aber im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr durchgeführt werden, sondern werden im Rahmen der Doktorarbeit von M. Heisig untersucht. Deshalb wird nur die Konstruktion der IE1-übertragenden Stämme mit der nachfolgenden *in vitro* Charakterisierung beschrieben.

5.1.2.1 Konstruktion der IE1-Expressionsplasmide für die drei Vakzinierungsstrategien

Für alle IE1-Expressionsplasmide diente das Plasmid pEMBL19-IE1 (W. Brune) als Ausgangs-plasmid. Dabei wurde die auf diesem Plasmid enthaltene komplette Gensequenz des IE1 in die vorher beschriebenen Expressionsplasmide für die einzelnen „Delivery“-Strategien kloniert. In der Abb.: 5.31 sind alle konstruierten IE1-Expressionsplasmide schematisch dargestellt.

Das pSP118-PS_{actA}IE1 Plasmid für die Expression des IE1 durch die Trägerbakterien selbst („Protein-Delivery“) wurde folgendermaßen hergestellt: Das 1782 bp große IE1-Fragment wurde mit den Primern IE1(*Nsi*I)-for und IE1 (*Nsi*I)-rev amplifiziert (Abb.: 5.32, A) und nach Gelaufreinigung mit dem Restriktionsenzym *Nsi*I verdaut. Anschließend wurde es mit dem *Nsi*I-verdauten Plasmid pUC18-PS_{actA}T_{inIA} ligiert, und in *E. coli* transformiert. Amp-resistente Klone wurden anschließend auf Vorhandensein des Plasmides pUC18-PS_{actA}IE1 per PCR überprüft.

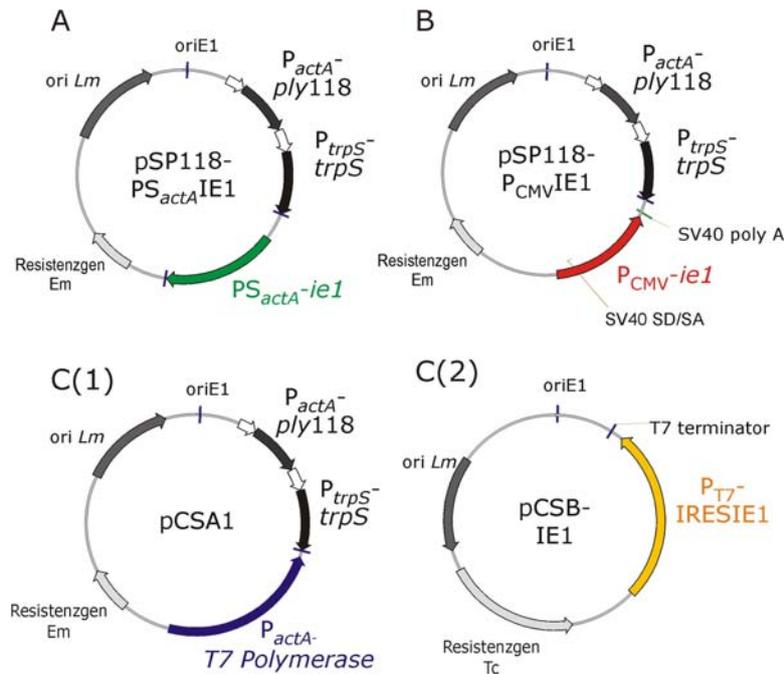


Abb. 5.31: Schematische Darstellung der IE1-Expressionsplasmide für die drei „Delivery“ Strategien. (A) Plasmid für das „Protein-Delivery“ und (B) Plasmid für das „DNA-Delivery“. (C1 und C2) das zwei Plasmid-System für das RNA-Delivery. *ori Lm*, Replikationsursprung für *Listeria*; *oriE1*, Replikationsursprung für *E. coli*; *trpS*, essentielles Gen von *Lm* kodiert unter Kontrolle des eigenen Promotors; P_{actA} -*ply118*, Autolysiskassette; Tc und Em, Resistenzgene. Die jeweiligen IE1-Expressionskassetten für die „Delivery“ Strategien und die T7 RNA Polymerase-Expressionskassette sind farbig dargestellt.

Aus einem positiven PCR-Klon wurde das Plasmid pUC18- PS_{actA} IE1 isoliert und nochmals per Verdau mit *SaI* und *XhoI* kontrolliert. Da das richtige Plasmid vorlag, fiel ein Fragment der Größe 473 bp heraus (Abb. 5.32, B). Die 2209 bp große IE1-Expressionskassette PS_{actA} *ie1* wurde schließlich über einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *SacI* und einem weiteren partiellen Verdau mit *PstI* aus dem Plasmid pUC18- PS_{actA} IE1 erhalten (Abb.: 5.32, C) um diese dann anschließend in den ebenfalls mit *PstI*- und *SacI*-verdauten Vektor pSP118 zu ligieren. Die Überprüfung der positiven Em-resistenten Klone fand durch PCR mit den Primern IE1(*NsiI*)-for und IE1 (*NsiI*)-rev (Abb. 5.32, D) oder durch Verdau mit den Enzymen *SacI* und *SacII* statt. Der richtige Verdau ergab ein Fragment der Größe 3379 bp (Abb.: 5.32, E).

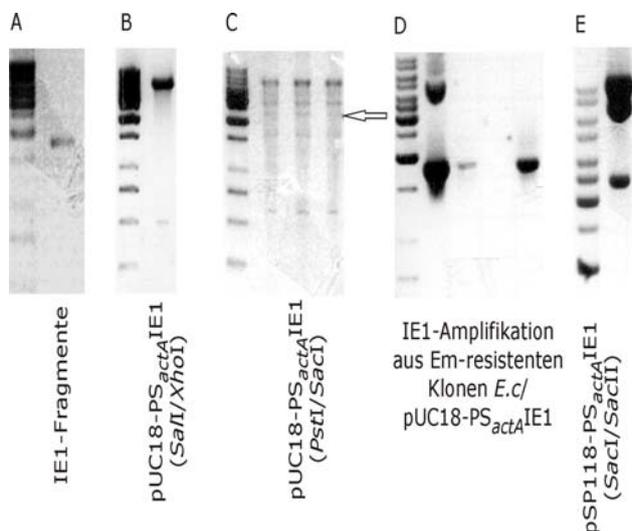


Abb. 5.32: Klonierung des Expressionsplasmides pSP118- PS_{actA} IE1 für das „Protein-Delivery“. (A) Amplifikation des 1782 bp großen Fragmentes IE1. (B) Überprüfung des positiven Amp-resistenten Klons pUC18- PS_{actA} IE1 mittels des Verdau mit *SaI*+*XhoI*. (C) Überprüfung des partiellen *PstI*-Verdau durch Gelelektrophorese. (D und E) Erhalt eines positiven Klones per PCR und dessen anschließender Überprüfung per *SacI* und *SacII*-Verdau. Der Pfeil weist auf das partiell verdaute Fragment der richtigen Größe.

Das Plasmid pSP118-P_{CMV}IE1 für das „DNA-Delivery“ wurde hergestellt, in dem das IE1-Fragment per PCR mit dem Primerpaar IE1(*NotI*)-for und IE1(*NotI*)-rev amplifiziert (Abb.:5.33, A) und anschließend mit dem Restriktionsenzym *NotI* verdaut und schließlich mit dem ebenfalls durch *NotI*-linearisierten Vektor pSP118-P_{CMV} ligiert wurde.

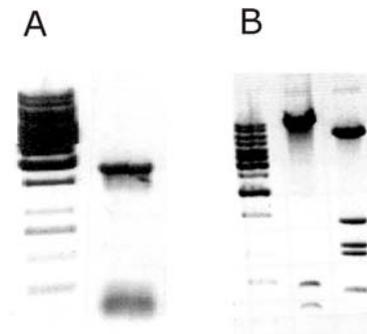


Abb. 5.33: (A) Amplifikation des IE1-Fragmentes mit anschließender Überprüfung der richtigen Größe (1782 bp) mit Hilfe der Gelelektrophorese. (B) Überprüfung des erhaltenen Plasmides pSP118-P_{CMV}IE1 aus einem positiven Em-resistenten Klon mittels des Restriktionsverdaus mit *EcoRV* und *SacI* (B, links) oder *PstI* und *SalI* (B, rechts).

Aus positiven Em-resistenten Klonen wurden die Plasmide isoliert und diese durch Verdau überprüft. Dabei müsste ein positiver Klon durch den *EcoRV* und *SacI*-Verdau die folgende Fragmentgrößen: 9734 bp, 708 bp und 542 bp und durch den *PstI* und *SacI* die Fragmentgrößen: 6718 bp, 1439 bp, 1107 bp, 1017bp und 103 bp aufweisen. Ein Klon zeigte sich positiv (Abb.: 5.33, B).

Das dritte IE1-Expressionsplasmid pCSB-IE1 wurde mittels rekombinanter PCR-Techniken hergestellt. In der ersten PCR wurden zwei Fragmente amplifiziert: ein 592 bp großes Fragment mit den Primerpaar IRES-(*XmaI*)-for und IE1-IRES für die Amplifikation der IRES-Sequenz aus dem Ausgangsplasmid pCSB1 und ein 1784 bp großes Fragment mit den Primern IRES-IE1 und IE1-*NotI*-rev für die Amplifikation der IE1-Sequenz aus dem Ausgangsplasmid pEMBL19-IE1 (Abb.: 5.34, A).

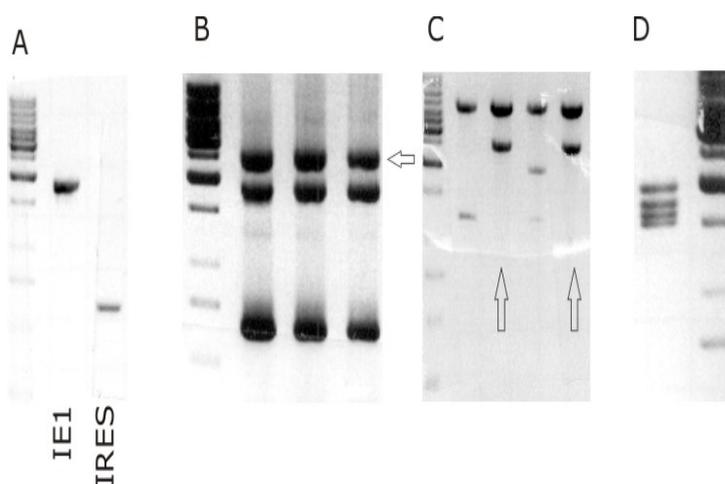


Abb. 5.34: Konstruktion des IE1-Expressionsplasmides pCSB-IE1 für das „RNA-Delivery“. (A) Amplifikation der beiden Fragmente IRES und IE1. (B) Rekombinate PCR des Fusionsproduktes IRES-IE1 (schwarzer Pfeil). (C) *XmaI/NotI*-Verdau vier Em-resistenter *E. coli/pSK*-IRES-IE1 und Erhalt des 2376 bp großen IRESIE1-Fragmentes (D) Positiver Klon pCSB-IE1 durch Überprüfung mittels *NcoI*-Verdau.

In einer zweiten PCR-Reaktion wurden diese beiden Fragmente miteinander fusioniert, um in einer anschließenden dritten PCR-Reaktion dieses Fusionsfragment IRES-IE1 mit dem Primerpaar IRES-(*XmaI*)-for und IE1-*NotI*-rev zu vervielfältigen (Abb.:5.34, B). Danach wurde das nun 2376 bp große Fragment mit den Restriktionsenzymen *XmaI* und *NotI* geschnitten, um es dann in den ebenfalls mit *XmaI/NotI*-verdauten pSK-Vektor zu klonieren. Durch die Anreicherung des

Fragmentes IRES-IE1 im Vektor pSK konnten weitere Klonierungsschritte erleichtert werden. Nachdem ein positiver Klon mittels des „BlueWhite-Screening“ erfolgreich ermittelt wurde, wurde aus diesem das Plasmid pSK-IRES-IE1 isoliert. Schließlich wurde das Fragment IRES-IE1 aus dem Plasmid pSK-IRES-IE1 durch die Restriktionsenzyme *Xma*I und *Not*I herausgeschnitten (Abb 5.34, C), um es anschließend in den ebenfalls mit *Xma*I und *Not*I-verdauten Vektor pCSB zu ligieren. Abschließend wurden Positiv-erhaltene Em-resistente Klone nach der Transformation des Plasmides pCSB-IE1 erst durch PCR und anschließend durch Verdau mit *Nco*I kontrolliert. Bei *Nco*I-Verdau des Plasmides pCSB-IE1 ergaben sich vier Fragmente mit folgender Größe: 1917 bp, 1722 bp, 1626 und 1550 bp (Abb.:5.34, C).

Alle IE1-Expressionsplasmide wurden in den Stamm *Lm* Δ *trpS*/p*flotrps* transformiert und mit dem ursprünglich enthaltenen Plasmid p*flotrps* nach Protokoll (\rightarrow 4.2.5) ausgetauscht.

5.1.2.2 Charakterisierung der IE1-Expressionsplasmide

5.1.2.2.1 Nachweis der Expression

Zunächst wurden Western Blot Analysen zur Quantifizierung der eukaryontischen IE1-Expression durchgeführt. Dazu wurden COS-1 Zellen transfiziert, in dem alle Expressionsplasmide, welche das IE1-Protein für das „Protein-Delivery“ (pSP118-PS_{actA}IE1), für das „DNA-Delivery“ (pSP118-P_{CMV}IE1) und für das „RNA-Delivery“ (pCSA1+pCSB-IE1) kodieren, in COS-1 Zellen nach Protokoll des LipofectAMINE PLUS Reagent Transfection Kits übertragen (\rightarrow 4.4.2.2). Als Positiv-Kontrolle wurde das Ursprungsplasmid pEMBL19-IE1 und als Negativ-Kontrollen das Plasmid pSP118 und unbehandete COS-1 Zellen verwendet. Drei Tage nach Transfektion wurden Zellextrakte (\rightarrow 4.3.2) hergestellt und Western Blot Analysen (\rightarrow 4.3.5) mit dem monoklonalen anti-IE1Antikörper durchgeführt.

Wie erwartet, wurde ein 89 kD schweres IE1-Protein mit dem typischen Abbaubandenmuster nur in Zellen nachgewiesen, die mit dem Plasmid pSP118-P_{CMV}IE1 und dem Ausgangsplasmid für die Klonierung pEMBL19-IE1 transfiziert worden sind. Nur diese Plasmide ermöglichen es, dass Wirtszellen das Ovalbumin transkribieren und translatieren können, da das IE1 unter der Kontrolle von eukaryotischen Promotoren in diesen Expressionsplasmiden kloniert wurde (Abb. 5.35, A, Spur 2 u. 5).

Für den weiteren *in vitro* Nachweis der Expression des IE1 durch den Protein- oder RNA-übertragenden Stamm wurde der Trägerstamm *Lm* Δ *trpS* verwendet. Für die Überprüfung der Expression und des Exportes durch den Trägerstamm *Lm* Δ *trpS*/pSP118-PS_{actA}IE1 selbst wurden alle *Lm* Trägerstämme, welche die verschiedenen IE1-Expressionsplasmide tragen, im Vollmedium BHI kultiviert und bis zu einer spätlogarithmischen Phase (OD₆₀₀=1.0) angezogen. Anschließend wurden intrazelluläre Proteine aus dem bakteriellen Pellet und sekretierte Proteine im Kulturüberstand nach Protokoll isoliert.

IE1 wurde sowohl im Kulturüberstand als auch im listeriellen Zellpellet des Protein-übertragenden Stammes mittels Western Blot Analysen nachgewiesen (Abb.: 5.35a, B, Spur 2 u. 6). Listerien, welche die IE1-RNA (Abb.:5.35a, A, Spur 4 u. 8) oder IE1-DNA (Abb.:5.35a, A Spur 3 u. 7) übertragen sollten, zeigten wie erwartet keine Expression des IE1-Proteins.

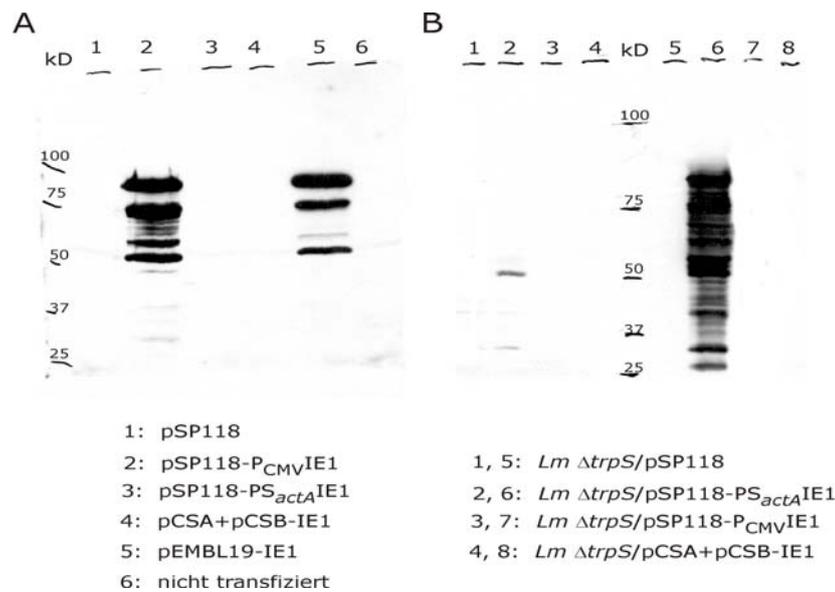


Abb. 5.35a: Nachweis der IE1-Expression im Western Blot. (A) Expression des IE1s durch COS-1 Zellen, 3 Tage nach Transfektion der IE1-Expressionsplasmide für das „DNA-Delivery“ (pSP118- P_{CMV} IE1), für das „Protein-Delivery“ (pSP118- PS_{actA} IE1) und für das „RNA-Delivery“ (pCSA1+pCSB-IE1) und der Kontrollplasmide. Zusätzlich wurde ein unbehandelter Zellextrakt als Negativ-Kontrolle hergestellt. Die Spur links gibt den Proteinstandard mit den entsprechenden kD Einheiten wieder. Die Spuren 1-6 kennzeichnen die einzelnen COS-1 Zellextraktproben. (B) Die Expression des IE1 (~ 89 kDa) in Zellextrakten und Kulturüberständen der *Lm* Trägerstämme und dem Kontrollstamm *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118; Spur 1-4 Überstandsproteine und Spur 5-8 zelluläre Proteine. In der Mitte ist der Proteinstandard mit entsprechenden Größen in kD aufgetragen.

Der Nachweis des IE1-mRNA, welche vom RNA-Delivery-Stamm transkribiert wird, gelang durch Slot-Blot Analyse (\rightarrow 4.1.2.3). Dafür wurde der RNA-übertragende Stamm *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB-IE1 und dessen Kontrollstamm *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB1 bis zur spätlogarithmischen Phase von 1.0 bei 600 nm in BHI Medium kultiviert. Anschließend wurde RNA aus den Pellets der jeweiligen Stämme isoliert und (5 μ g) als Proben in der Slot-Blot-Analyse eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde reines Plasmid pSP118- PS_{actA} IE1 verwendet. Die transkribierte IE1-mRNA wurde dabei chemilumineszierend durch die Anhybridisierung einer spezifischen IE1-Sonde, welche zuvor mit dem Primerpaaren IE1checkfor und IE1checkrev aus dem Plasmid pSP118- PS_{actA} IE1 amplifiziert und anschließend mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt wurde, detektiert (Abb.: 5.35b). Die transkribierte IE1-mRNA wurde tatsächlich in dem Stamm *Lm* $\Delta trpS$ / pCSA1+pCSB-IE1 nachgewiesen.

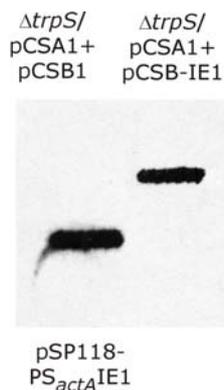


Abb. 5.35b: Nachweis der Transkription des IE1 durch den „RNA-Delivery“-Stamm *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB-IE1 mittels Slot-Blot-Analyse. Der RNA-Delivery Stamm und sein Kontrollstamm *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB1 wurden bis zu einer OD von 1.0 bei 600 nm kultiviert und anschließend wurde die RNA aus diesen isoliert und eine Slot-Blot-Analyse durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle ist das reine Plasmid pSP118- PS_{actA} IE1 und als Negative-Kontrolle die RNA aus dem Kontrollstamm *Lm* $\Delta trpS$ /pCSA1+pCSB1 aufgetragen worden.

5.2 Der Einfluss der kompartiment-spezifischen und bakteriellen Expression des Antigens auf die primäre Aktivierung von T-Lymphozyten

Im zweiten Teil der Arbeit sollte unter der Verwendung von virulenzattenuierten *Lm* Stämmen als Träger heterologer Antigene untersucht werden, wie sich die bakterielle und die kompartiment-spezifische Expression eines durch Listerien übertragenen Antigens auf die primäre Aktivierung von T-Zellen auswirkt.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurde erneut das Hühnereiweiß Ovalbumin als Modellantigen verwendet. In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, daß die kompartiment-spezifische Expression das Ausmaß und den Typ der Immunantwort beeinflusst [274, 68]. Es gibt aber bislang noch keine eindeutigen Daten darüber, auf welche Art und Weise man diese heterologen Antigene von Listerien exprimieren lässt, um eine effiziente Antigenpräsentation mit nachfolgender Antigen-spezifischer T-Zellaktivierung zu induzieren, so dass anschließend möglichst langanhaltende protektive zelluläre wie auch humorale Immunantworten generiert werden. Exportierte Antigene scheinen generell einen besseren Zugang zum Immunsystem zu haben, als in den Bakterien verbleibende Proteine (wird nachfolgend auch als intrazelluläre Proteine bezeichnet) [155] und einige Studien belegten sogar, dass die Sekretion des Antigens eine wesentliche Voraussetzung für die Induktion einer protektiven Zellantwort war [126, 125, 58]. Andere Arbeitsgruppen widerlegten dies und wiesen nach, dass sowohl von *Listeria* exportierte als auch zellwandverankerte und intrazelluläre exprimierte Antigene gleichermaßen starke T-Zellantworten auslösen [116, 274].

Ebenfalls ist noch unklar, in welchem Kompartiment der Wirtszelle die Antigenexpression stattfinden sollte, um anschließend gleichermaßen protektive zelluläre wie auch humorale Immunantworten zu generieren. Im Allgemeinen, werden Antigene, welche ins phagosomale Kompartiment gelangen, vorwiegend von MHC-Klasse-II Molekülen prozessiert und präsentiert und deshalb hauptsächlich von CD4⁺ T-Zellen erkannt. Antigene dagegen, welche in das Zytosol gelangen, werden vorwiegend über dem MHC-Klasse-I-Weg den CD8⁺ T-Zellen präsentiert.

Demnach ist es für Vakzinierungszwecke entscheidend, die Art und Weise der Antigenexpression, die Stabilität des Antigens, sowie die Lokalisierung des Antigens durch den Träger festzulegen, da dies den Typ und die Stärke der gegen das Antigen gerichteten Immunantwort beeinflusst [68].

Um diesen Einfluss quantitativ zu untersuchen, sollte ein direkter Vergleich desselben Antigens, das in verschiedenen Kompartimenten exprimiert wird, stattfinden. Dafür wurden rekombinante *Lm* Stämme konstruiert, welche ein verkürztes Ovalbumin, bestehend aus den aa 145-386 exprimieren, welches entweder aus der Bakterienzelle exportiert wird, zellwandverankert exprimiert wird oder nach Expression in den Bakterien verbleibt. Gleichzeitig wurden alle drei unterschiedlich exprimierten OVA-Proteine jeweils unter der Kontrolle zweier listerieller Promotoren kloniert, welche in unterschiedlich zellulären Wirtskompartimenten vermutlich verstärkt aktiviert werden.

5.2.1 Konstruktion von unterschiedlichen bakteriellen Expressionskassetten für Ovalbumin

Das *E.coli-Listeria* Shuttle-Plasmid pSP0 wurde verwendet, um *Lm* Stämme zu konstruieren, welche Ovalbumin als exportiertes, zellwandverankertes oder als Protein, welches in den Bakterien verbleiben soll, exprimieren. Die verschiedenen Ovalbuminexpressionskassetten ($PS_{actA-ova}$, $PS_{actA-ova}$ -Anker_{*inlA*}, $P_{actA-ova}$, $PS_{hly-ova}$, $PS_{hly-ova}$ -Anker_{*inlA*} und $P_{hly-ova}$) wurden auf diesem Plasmid inseriert (Abb.: 5.3.6). Dabei setzten sich jeweils die Ovalbuminexpressionskassetten, welche für ein Ovalbumin kodieren, das von *Lm* exportiert ($PS_{actA-ova}$ und $PS_{hly-ova}$) oder intrazellulär ($P_{actA-ova}$ und $P_{hly-ova}$) in den Bakterien verbleiben soll, aus einem listeriellen Promotor, dem kodierenden Bereich für ein Signalpeptid (nicht für das intrazelluläre Protein) und der OVA-DNA bestehend aus dem kodierenden Bereich für AS 145-386 zusammen. Für die exprimierten zellwandverankerten Ovalbumine, welche von den Expressionskassetten $PS_{actA-ova}$ -Anker_{*inlA*} und $PS_{hly-ova}$ -Anker_{*inlA*} kodiert werden, wurde zusätzlich die Ankersequenz des *inlA*-Gens (AS 693-800) an die cDNA des Ovalbumins angehängt. Als Promotoren wurden die Promotoren der Gene *hly* und *actA* verwendet, um damit die wirtskompartiment-spezifische Expression der Ovalbumine zu erreichen (Abb.: 5.37). Der Promotor des Gens *hly*, welches für Listeriolysin (LLO) kodiert, ist bereits sehr früh nach Eintritt des Bakteriums im phagosomalen Kompartiment aktiv, da das porenformende Toxin LLO zur Öffnung der Phagosomenmembran benötigt wird. ActA dagegen wird im Zytosol der Wirtszelle zur Nukleation des Aktins benötigt. Daher ist der *actA*-Promotor vorwiegend nach Übergang der Bakterien im Zytosol aktiv [36, 212].

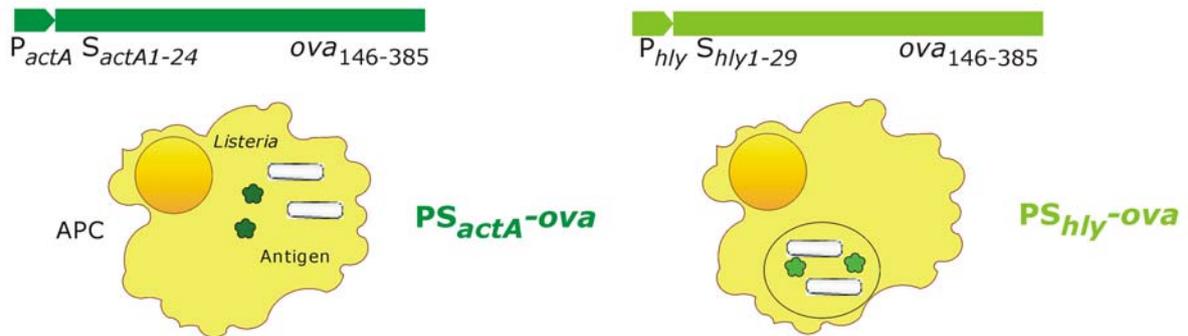
Die fertigen Expressionsplasmide pSP0- $PS_{actA}OVA$, pSP0- $PS_{hly}OVA$, pSP0- $PS_{actA}OVA$ -Anker, pSP0- $PS_{hly}OVA$ -Anker, pSP0- $P_{actA}OVA$ und pSP0- $P_{hly}OVA$ wurden in Kooperationsarbeit von C. Schoen und die beiden letzt genannten im Rahmen dieser Arbeit hergestellt, deren Konstruktion nachfolgend beschrieben wird.

Die beiden Plasmide pSP0- $P_{actA}OVA$ und pSP0- $P_{hly}OVA$ wurden mit der gleichen Strategie kloniert. Für die Konstruktion der OVA-Expressionskassetten $P_{actA-ova}$ und $P_{hly-ova}$ wurden zunächst die Promotoren P_{actA} mit den Primerpaaren $P_{actA}(XbaI)$ + $P_{actA}(PstI)$ und P_{hly} mit den Primerpaaren $P_{hly}(XbaI)$ + $P_{hly}(PstI)$ per PCR amplifiziert. Die 723 bp große *ova*-Sequenz wurde durch *NsiI*-Verdau des Plasmides pUC18- $PS_{actA}OVA$ erhalten. Anschließend wurde die *ova*-Sequenz mit den jeweiligen Promotorsequenzen über den Verdau mit dem isoschizomeren Enzym *PstI* des *NsiI* ligiert. Die resultierenden Fragmentfusionen $P_{actA-ova}$ (960 bp) und $P_{hly-ova}$ (960 bp) wurden in einem weiteren Schritt per PCR mit den Primerpaaren $P_{actA}(XbaI)$ + 3' *ova* C-Terminus(*NsiI*) und $P_{hly}(XbaI)$ + 3' *ova* C-Terminus (*NsiI*) angereichert und per Agarosegelelektrophorese überprüft. Anschließend erfolgte der *XbaI* und *NsiI*-Verdau der Fragmentfusionen $P_{actA-ova}$ und $P_{hly-ova}$ und deren Ligation in den ebenfalls mit *XbaI*- und *NsiI*-verdauten Vektor pUC18- T_{inlA} . Dieser linearisierte Vektor entstand durch den vorherigen Verdau des Vektors pUC18- $PS_{actA}OVA$ mit *XbaI* und *NsiI*, bei dem das Fragment $PS_{actA-ova}$ herausfiel. Mittels Amp-Screenings wurden positive Klone, welche die Plasmide pUC18- $P_{actA}OVA$ und pUC18- $P_{hly}OVA$ enthalten, erhalten. Nach Plasmidisolierung wurden die Plasmide pUC18- $P_{actA}OVA$ und pUC18- $P_{hly}OVA$ mit *PstI* und *SacI* partiell verdaut und die dadurch gewonnen verdauten Fragmente $P_{actA-ova-T_{inlA}}$ (1067 bp) und P_{hly-}

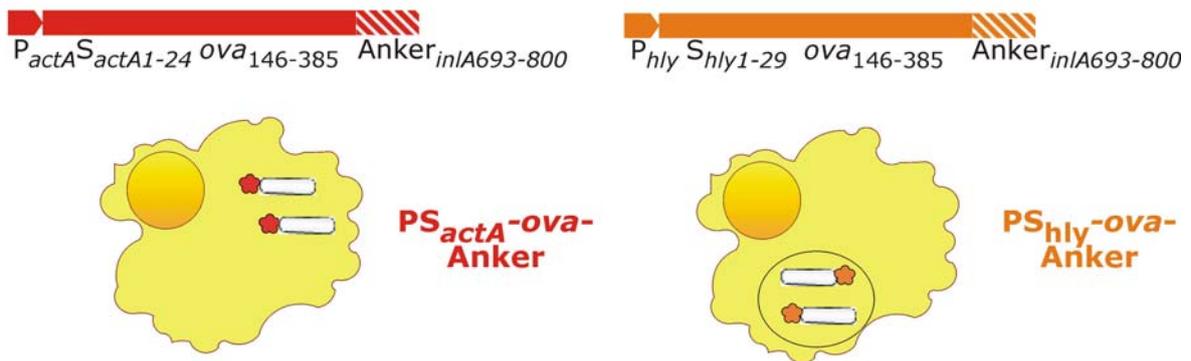
ova-T_{inIA} (1067 bp) wurden in den ebenfalls mit *PstI* und *SacI* linearisierten Vektor pSP0 ligiert, resultierend in den Vektoren pSP0-P_{actA}OVA und pSP0-P_{hly}OVA.

Anschließend wurden die Plasmide pSP0-PS_{actA}OVA, pSP0-PS_{hly}OVA, pSP0-PS_{actA}OVA-Anker, pSP0-PS_{hly}OVA-Anker, pSP0-P_{actA}OVA und pSP0-P_{hly}OVA in die *Lm* Deletionsmutante $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pflotrps$ transformiert und gegen das ursprüngliche Plasmid *pflotrps* nach Protokoll (\rightarrow 4.2.5) ausgetauscht.

Exportierte Ovalbumine



Zellwandverankerte Ovalbumine



Ovalbumine, welche in den Listerien verbleiben

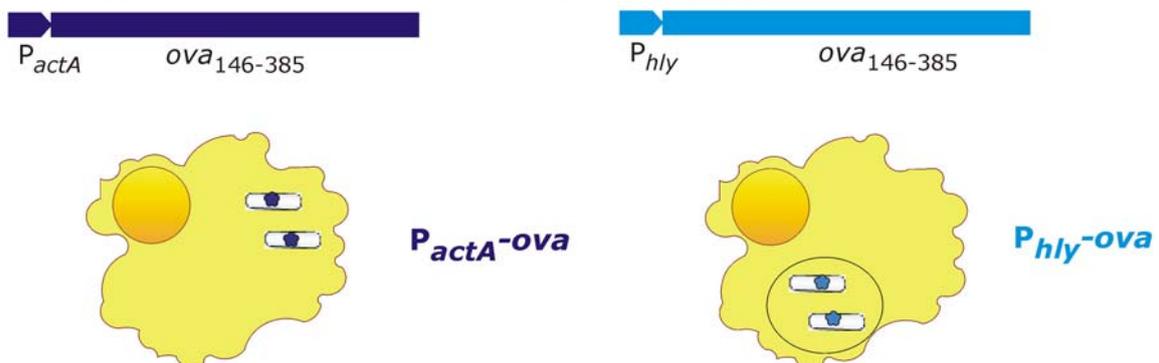


Abb. 5.37: Schematische Darstellung der unterschiedlichen OVA-Expressionskassetten und die Modellvorstellung der Kompartimentalisierung der Ovalbumine nach Expression durch Listerien. *PactA*, Promotor des *actA*-Gens; *Phly*, Promotor des *hly*-Gens; *SactA*, Signalsequenz des *actA*-Gens; *Shly*, Signalsequenz des *hly*-Gens; *ova*, cDNA von Ovalbumin kodierend für aa145-386; *Anker_{inIA}*, Ankersequenz des *inIA*-Gens kodierend für aa 693-800.

5.2.2 Nachweis der OVA-Expression und Lokalisation in den rekombinanten *Lm* Stämmen

Für den Nachweis der Expression und Lokalisation der Ovalbumine durch die unterschiedlichen *Lm* Stämme wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dafür wurden alle Ova-exprimierenden *Lm* Stämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{hly}OVA$ und der Kontrollstamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$ in BHI mit Amberlite™ XAD-4 bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 1.0 bei 600 nm kultiviert. Der Zusatz von Amberlite™ XAD-4 aktiviert genauso wie der Zusatz von Aktivkohle den Transkriptionsregulator PrfA des Virulenzgenclusters und damit wird indirekt auch die Expression der Virulenzgene aktiviert [78]. Diese Aktivierung geschieht normalerweise, sobald *Lm* an die Zellwand von eukaryotischen Zellen adhärirt [246]. Intrazellulär werden diese Virulenzgene sehr aktiv exprimiert [212].

Anschließend wurden die intrazellulären, zellwandverankerten und exportierten Proteine eines jeden Stammes nach Protokoll (\rightarrow 4.3.1) isoliert und für Western Blot Analysen aufgearbeitet. Das aufgereinigte anti-OVA Kaninchenserum und der sekundäre Peroxidase-konjugierte Ziege anti-Kaninchen Antikörper diente zur Detektion der exprimierten Ovalbumine. Bei einer Detektion der intrazellulären und exportierten OVA-Proteine müssten Banden bei 27 kD, wobei für die zellwandverankerten OVAs aufgrund der Fusion mit dem Zellwandanker des InIAs, Banden bei 37 kD, sichtbar sein.

Wie in der Abb. 5.38 zu sehen ist, konnte die Expression aller unterschiedlich-exprimierten Ovalbumine der entsprechenden *Lm* Stämmen in den Proteinfractionen der intrazellulären Proteine, nachgewiesen werden (Abb.: 5.38, Blot intrazelluläre Proteine, schwarze Pfeile 4 u. 5). Generell synthetisierten die Stämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{hly}OVA$ (Abb.: 5.38, Blot intrazelluläre Proteine, Stämme 3, 5 u. 7), welche OVA unter der Kontrolle des *hly*-Promotors exprimierten, intrazellulär mehr OVA, da eine dickere OVA-Bande detektiert wurde (Abb.: 5.38, Blot intrazelluläre Proteine, Stamm 3, 5 u. 7). Ebenso wurde mehr Hintergrund in diesen Stämmen nachgewiesen. Auffallend war ferner, dass eine 27 kD schwere Bande (Pfeil 5) neben der eigentlich gewünschten Bande von 37 kD (Pfeil 4) zusätzlich in den Zellpellets der Stämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker (Abb.: 5.38, , Blot intrazelluläre Proteine, Stamm 4) und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker (Abb.: 5.38, , Blot intrazelluläre Proteine, Stamm 5), welche OVA zellwandverankern, auftauchte.

Ovalbumin-Moleküle (~37 kD), welche kovalent an die Zellwand binden, wurden bei entsprechender 1000-facher Anreicherung in der Fraktion der Oberflächenproteine detektiert, welche aus den *Lm* Stämmen $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker (Abb.: 5.38, Blot Oberflächenproteine, Stamm 4) und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker_{inIA} (Abb.: 5.38, Blot Oberflächenproteine, Stamm 5) isoliert worden sind (Abb.: 5.38, Blot Oberflächenproteine, Pfeil 2). Außerdem zeigten Ovalbumin-exportierende Stämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ (Abb.: 5.38, Blot Oberflächenproteine, Stamm 2) und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ (Abb.: 5.38, Blot Oberflächenproteine, Stamm 3) auch eine starke Ovalbuminbande in der Fraktion der Oberflächenproteine auf (Abb.: 5.38, Pfeil 3). Demnach scheinen die exprimierten Ovalbumine teilweise beim Transport über die Zellwand festzustecken (Abb.: 5.38, Blot Oberflächenproteine, Pfeil 3). Vorallem das Ovalbumin, das der Stamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$, welcher OVA

unter dem *actA*-Promotor exprimiert und exportiert, steckte vermehrt in der Zellwand fest. Jedoch wurde bei den Fraktionen der Oberflächenproteine der Stämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{actA}OVA$ und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{hly}OVA$ jeweils auch eine schwache Bande bei 27 kD nachgewiesen. Ebenso wurde das Ovalbumin (~27 kD) in den Fraktionen der Überstandsproteine der Stämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ (Abb.: 5.38, Blot Überstandsproteine, Stamm 2) und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ (Abb.: 5.38, Blot Überstandsproteine, Stamm 3), welche Ovalbumin exportieren, detektiert. Die anderen Stämme zeigten dagegen keinen Export des Ovalbumins über die Zellwand. Der Kontrollstamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$ (Abb.: 5.38, Stamm 1) zeigte dagegen wie erwartet keine Expression des OVAs in allen drei aufgearbeiteten Proteinfractionen.

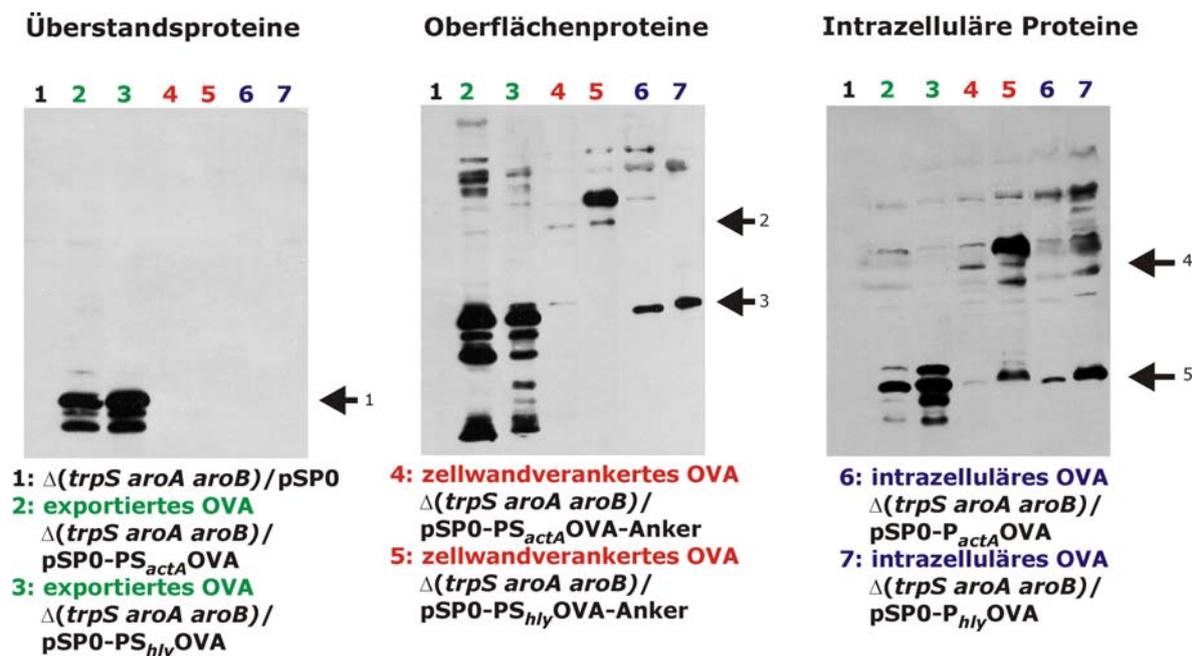


Abb. 5.38: Nachweis der Expression und der Lokalisierung von Ovalbumin in den *Lm* Stämmen $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{hly}OVA$ nach Anzucht in BHI mit XAD. Die Ovalbuminexpression wurde mittels Westernblot von Oberflächen-, Überstandsproteinen und intrazelluläre Proteinen der Stämme durchgeführt. Die Oberflächenproteine waren 1000fach angereichert. Die Anreicherung der intrazellulären und exportierten Proteine erfolgte um den Faktor 50. Schwarze Pfeile kennzeichnen die relevanten detektierten Ovalbuminbanden (Pfeil 1, 3, 5 für OVA: 27 kD und Pfeil 2 u. 4 für OVA: 37 kD).

5.2.3 Einfluss der bakteriellen Lokalisation des OVAs auf die Vitalität und Virulenz der Trägerstämme

Um den Einfluss der bakteriellen Lokalisation (in Bakterien verbleibendes, zellwandverankertes oder exportiertes Protein) des OVAs auf die Vitalität und Virulenz der entsprechenden Trägerstämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{hly}OVA$ zu untersuchen, wurden Wachstumskurven der Stämme erstellt und Invasions- und Replikationsassays mit diesen Stämmen durchgeführt.

Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens der Trägerstämme wurden alle sechs Stämme und der Kontrollstamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$ im BHI-Medium ohne und mit XAD (1 %) kultiviert. Im Gegensatz zum BHI ohne XAD wachsen die Stämme in BHI mit XAD unter induzierten PrfA-Bedingungen [102]. Zu jeder Stunde über einen Zeitraum von 12 Stunden wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm am Spektralphotometer gemessen.

Im Vergleich zum WT Stamm *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$ wurde bei allen sechs Stämme ein ähnliches Wachstumsverhalten in BHI ohne XAD nachgewiesen (Abb. 5.39).

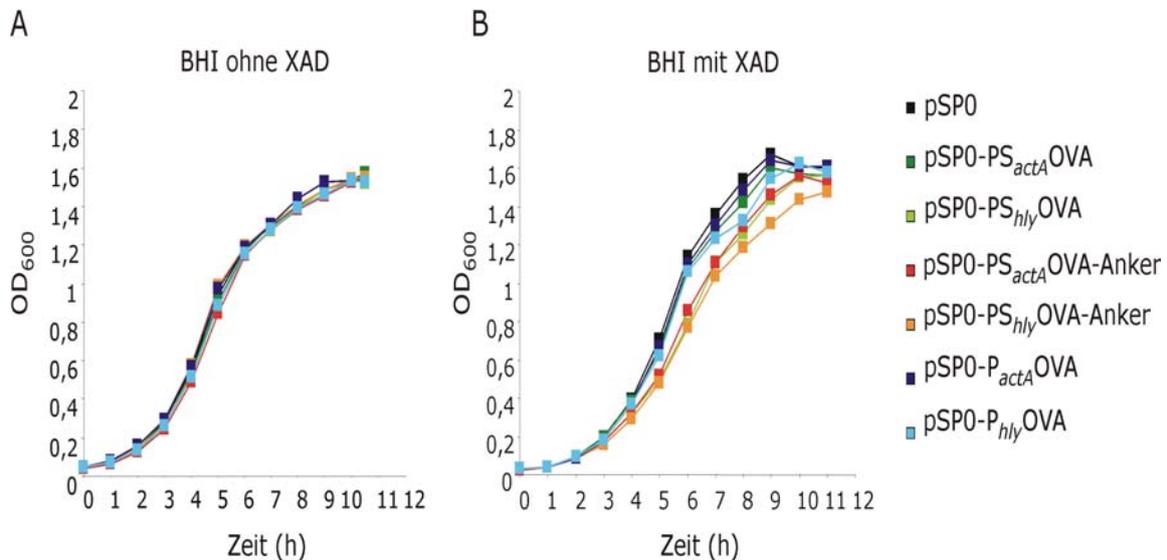


Abb. 5.39: : Wachstumskurven der *Lm* Stämme mit den jeweiligen OVA-Expressionsplasmiden im BHI ohne (A) und mit XAD (B). *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$ (negativ Kontrolle) und die relevanten „Protein-Delivery“-Stämme zeigen ein ähnliches Wachstum im BHI ohne XAD. Im BHI mit XAD, unter PrfA-aktivierenden Bedingungen, zeigen die relevanten „Protein-Delivery“-Stämme ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zu dem WT Stamm *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$. Die optische Dichte der Kulturen wurde bei 600 nm gemessen. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren einen Versuch aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

In BHI mit XAD dagegen gab es Unterschiede zum wildtypischen Stamm. Der Zusatz des XADs beeinflusste negativ das Wachstumsverhalten aller OVA-Stämme, sobald sie von der Lag- in die Log-Phase übergegangen sind. Diese zeigten im Vergleich zum WT eine Wachstumsverzögerung. Vor allem Stämme, die Ovalbumin exprimieren und anschließend zellwandverankern, zeigten schon beim Eintritt in die Log-Phase ein langsames Wachstum (Abb.: 5.39, rote und orange Kurve), gefolgt von den Stämmen, welche OVA exprimieren und anschließend exportieren (Abb.: 5.39, grüne u. olive Kurve). Listerien, welche Ovalbumin intrazellulär belassen, zeigten zu Beginn der Log-Phase dagegen ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der WT, jedoch kam es ebenso zu einer Wachstumsverzögerung in spätlogarithmischen Phasen (Abb.: 5.39, dunkelblaue u. hellblaue Kurve). Generell zeigten Stämme, welche Ovalbumin unter der Kontrolle des *hly*-Promotors exprimieren, ein langsames Wachstum in BHI mit XAD im Vergleich zu den Stämmen, welche Ovalbumin unter der Kontrolle des *actA*-Promotors exprimieren.

Nachdem das extrazelluläre Verhalten in BHI-Medium charakterisiert wurde, wurden Invasions- und Replikationsassays zur Bestimmung der Virulenz dieser Stämme durchgeführt. Dafür wurden CACO-2 Zellen mit diesen sechs Stämmen und dem Kontrollstamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$ für 1 h

im Dreifachansatz infiziert und anschließend wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien in den infizierten CACO-2 Zellen durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt. Parallel dazu wurden weitere Infektionsansätze mit diesen sieben *Lm* Stämmen in dreifacher Ausführung 24 h im Zellkulturschrank weiter inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Bestimmung der lebenden intrazellulären Bakterien.

Wie in nachfolgender Abb. 5.40 zu sehen ist, zeigten einzelne Stämme im Vergleich zum WT ein Invasionsdefizit in CACO-2 Zellen, vor allem die Stämme, welche Ovalbumin exportieren (Abb. 5.40: A1, grün: $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ und oliv: $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$) oder an die Oberfläche verankern (Abb. 5.40: A1, rot: $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker und orange: $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker). Die *Lm* Stämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{actA}OVA$ (Abb.: 5.40, A1, blau) und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{hly}OVA$ (Abb.: 5.40, A1, türkis), in denen Ovalbumin intrazellulär verbleibt, invadierten fast genauso gut wie der WT in die CACO-2 Zellen.

Neben einer schlechten Invasionsfähigkeit vermehrten sich die Stämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ (Abb.: 5.39, C, grün) und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker (Abb.: 5.40, A2, rot) kaum intrazellulär in CACO-2 Zellen. Im Gegensatz dazu, hatten sich die beiden Vergleichsstämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ (Abb.: 5.40, A2, oliv) und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker (Abb.: 5.40, A2, orange), bei denen die OVA-Expressionskassette unter der Kontrolle des *hly*-anstelle des *actA*-Promotors steht, intrazellulär vermehrt. Auch Listerien, die intrazelluläres Ovalbumin exprimieren, zeigten ein intrazelluläres Wachstum vergleichbar zum WT in CACO-2 Zellen.

Demnach scheint das heterologe Ovalbumin, sobald es von den Listerien exportiert oder Oberflächen verankert wurde, einen Einfluß auf die Invasion und Replikation in nicht-phagozytischen Zellen zu haben. Besonders die Stämme, bei denen die OVA-Expressionskassetten für den Export und der Zellwandverankerung unter der Kontrolle des *actA*-Promotors stehen, zeigten einen verstärkten Einfluß auf die Invasions- und Replikationsfähigkeit.

Des Weiteren wurden auch phagozytische Zellen wie murine Makrophagen (J774) mit diesen Stämmen in einer MOI von 5 infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gentamycinzugabe wurde die Infektion gestoppt und die intrazelluläre Bakterienzahl durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt. Dabei wurde festgestellt, das auch das Phagozytieren von Bakterien durch Makrophagen durch die bakterielle Lokalisierung des OVAs beeinflusst wurde, vor allem, wenn Ovalbumin von den Bakterien exportiert oder an die bakterielle Oberfläche verankert wird. Die Aufnahme war zwischen 20-70 % reduziert. Generell wurden Stämme, welche OVA unter der Kontrolle des *hly*-Promotors exprimieren, besser phagozytiert, als Stämme, welche OVA unter der Kontrolle des *actA*-Promotors exprimieren (Abb. 5.40, B1).

Intrazellulär vermehrten sich alle Stämme in den ersten Stunden nach Phagozytose, bis auf die Stämme $\Delta trpS/PS_{actA}OVA$ und $\Delta trpS/PS_{actA}OVA$ -Anker, welche auch schon vermindert aufgenommen worden sind. Fünf Stunden nach Gentamycinbehandlung verringern sich die lebende Bakterienanzahl aller intrazellulären Stämme in den Makrophagen (Abb.: 5.40, B2).

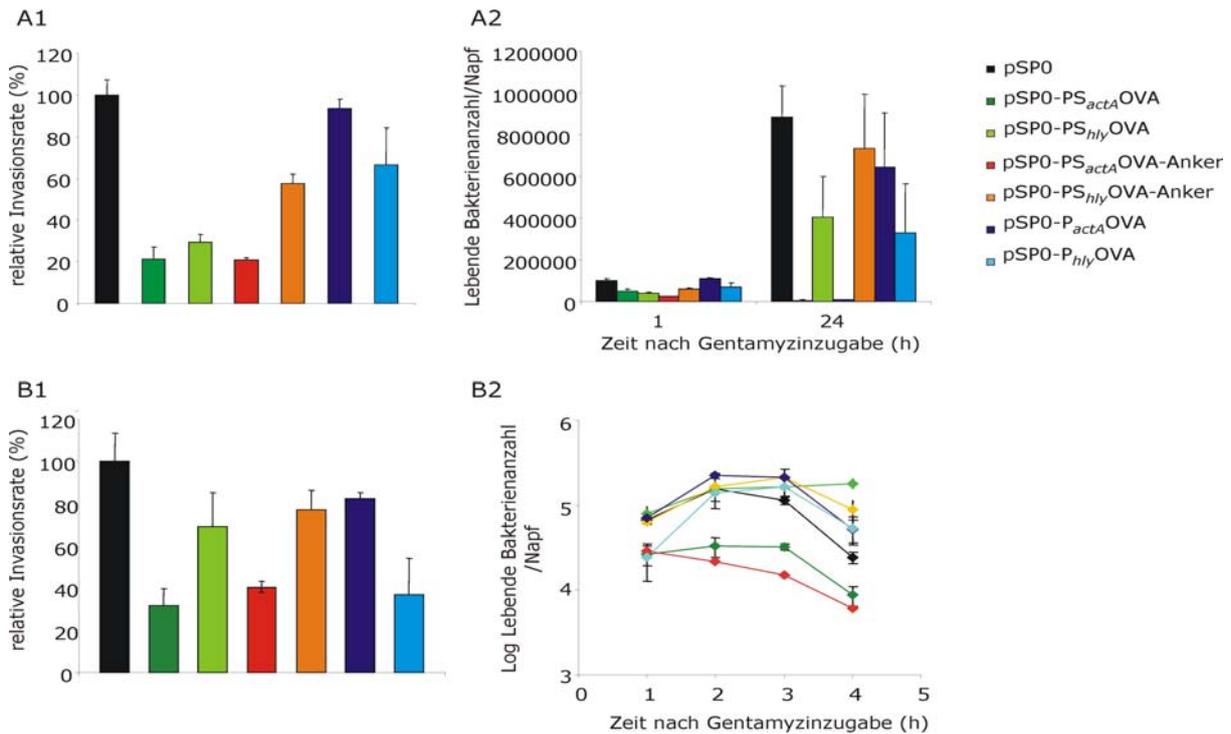


Abb. 5.40: Vergleich der Invasionsfähigkeit (A1, B1) und der intrazellulären Vermehrung (A2, B2) in CACO-2 Zellen (A) und J774 Makrophagen (B) der Stämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{actA}OVA$ und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{hly}OVA$ untereinander. Zellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert. Balken und Standardabweichungen stellen Mittelwerte aus drei Daten der einzelnen Stämme eines repräsentativen Versuches von zwei durchgeführten dar.

5.2.4 Primäre Aktivierung von OVA-spezifischen T-Lymphozyten

Nachdem nun alle *Lm* Stämme, die Ovalbumin nach Expression exportieren, an die Oberfläche verankern oder intrazellulär belassen, *in vitro* charakterisiert worden sind, stellte sich in diesem Teil der Arbeit die Frage, ob diese Listerien durch die Übertragung der unterschiedlichen Expressionsarten des Ovalbumins in unterschiedliche Wirtskompartimente (Phagosom und Zytosol) eine unterschiedlich primäre Aktivierung von T-Lymphozyten ermöglichen. Dies kann wieder mit hoher Sensitivität und schneller als bei einem "echten" „Priming“ durch den adoptiven Transfer von naiven TCR-transgenen CD8 T-Zellen aus OT-I oder TZR-transgenen CD4 T-Zellen aus OT-II Mäusen bestimmt werden [227, 259].

Dafür wurden Milzzellen aus den transgenen OT-I oder OT-II Mäusen gewonnen und 10^7 Milzzellen in jede C57BL/6 Rezipientenmaus von 7 Versuchsgruppen transferiert (eine Versuchsgruppe bestand dabei aus 3 Mäusen). 24 h später wurde jede Mausgruppe jeweils mit einem der sechs OVA-exprimierenden *Lm* Stämmen $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{hly}OVA$ und dem Kontrollstamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$ infiziert. Drei Tag nach Infektion wurden die Milzzellen aus den Rezipientenmäusen isoliert und für durchflußzytometrische Analysen aufgearbeitet. In 2×10^6

Milzzellen wurden durch Anfärbung mit dem Antikörpergemisch aus anti-V α 2, anti-V β 5 und anti-CD8 der prozentuale Anteil an transferierten und evtl. expandierten CD8⁺ T-Zellen durchflußzytometrisch ermittelt. Um dagegen den prozentualen Anteil an transferierten, expandierten CD4⁺ T-Zellen zu bestimmen, wurde das Antikörpergemisch aus anti-V α 2, anti-V β 5 und anti-CD4 verwendet.

Zusätzlich wurden den infizierten Mäusen, in die einen Tag vorher OT-I Zellen transferiert worden waren, die Lebern entnommen. Diese wurden homogenisiert und mit Ultraschall behandelt, um nachfolgend intrazelluläre Listerien in geeigneten Verdünnungen auszuplattieren. Dadurch sollte festgestellt werden, ob OT-I Zellen ihre Effektorfunktion, also das Abtöten erkannter infizierter Zellen ausführen [17, 164].

Wie in nachfolgender Abb. 5.41 A zu sehen ist, aktivierten die sechs *Lm* Stämme, welche Ovalbumin als exportiertes, als zellwandverankertes oder als intrazelluläres Protein exprimierten, und anschließend diese drei verschiedenen exprimierten Ovalbumine in das Phagosom oder ins Zytoplasma der Wirtszelle freisetzen, die CD8⁺ T-Zellen gleichermaßen gut. Es wurden klonale Expansionen dieser CD8⁺ T-Zellen durch diese Stämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{hly}OVA$ um die 50-60 % erreicht. Demnach spielt die Art und Weise der Expression des heterologen OVA und auch die anschließende zelluläre Lokalisation des OVA keine Rolle für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen über den MHC-Klasse-I Präsentationsweg.

Die Stimulation der CD4⁺ T-Zellen über den MHC-Klasse-II Präsentationsweg zeigte dagegen ein anderes Bild (Abb.: 5.41, B). Hier gab es deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen bezüglich der Expressionsart und auch der Kompartimentalisierung des OVA durch die Bakterien im Wirt. Die Stämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$, welche Ovalbumin exportieren, konnten am effizientesten die OT-II-transferierten CD4⁺ T-Zellen über den Präsentationsweg der MHC-Klasse-II Moleküle primen, gefolgt von den Stämmen, welche OVA als Oberflächenprotein verankern (Abb.: 5.41, B, rot, u. orange) und als intrazellulär verbleibendes Protein exprimierten (Abb.: 5.41, B, blau u. türkis). Des Weiteren zeigte der *Lm* Stamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$, welcher Ovalbumin als exportiertes Protein ins Kompartiment des Phagosoms freisetzt, die effizienteste Aktivierung (24.68 %). Auch bei den Stämmen, welche Ovalbumin als intrazelluläres Protein exprimieren, zeigte der Stamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{hly}OVA$, welcher OVA unter der Kontrolle des *hly*-Promotors exprimiert, eine höhere Aktivierung (8.74 %), als der Stamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{actA}OVA$, welcher OVA unter der Kontrolle des *actA*-Promotors exprimiert (3.82 %). Bemerkenswert ist allerdings, dass der Stamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker, welcher OVA unter der Kontrolle des *actA*-Promotors an die bakterielle Zellwand verankert, effizienter im Aktivieren der CD4⁺ T-Zellen war, als sein Vergleichsstamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker, welcher OVA unter der Kontrolle des *hly*-Promotors exprimiert und an die bakterielle Zellwand verankert.

In allen ausplattierten Leberhomogenisaten wurden signifikant niedrigere Zahlen an Listerien im Vergleich zur Kontrolle *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$ gefunden (Abb.: 5.41, C). Mäuse, welche mit Listerien infiziert wurden, die Ovalbumin exportierten oder an die eigene Oberfläche verankerten, schienen generell weniger Listerien in den Lebern enthalten zu haben, als Mäuse, welche mit Listerien infiziert wurden, die Ovalbumin nicht exportieren oder verankern konnten.

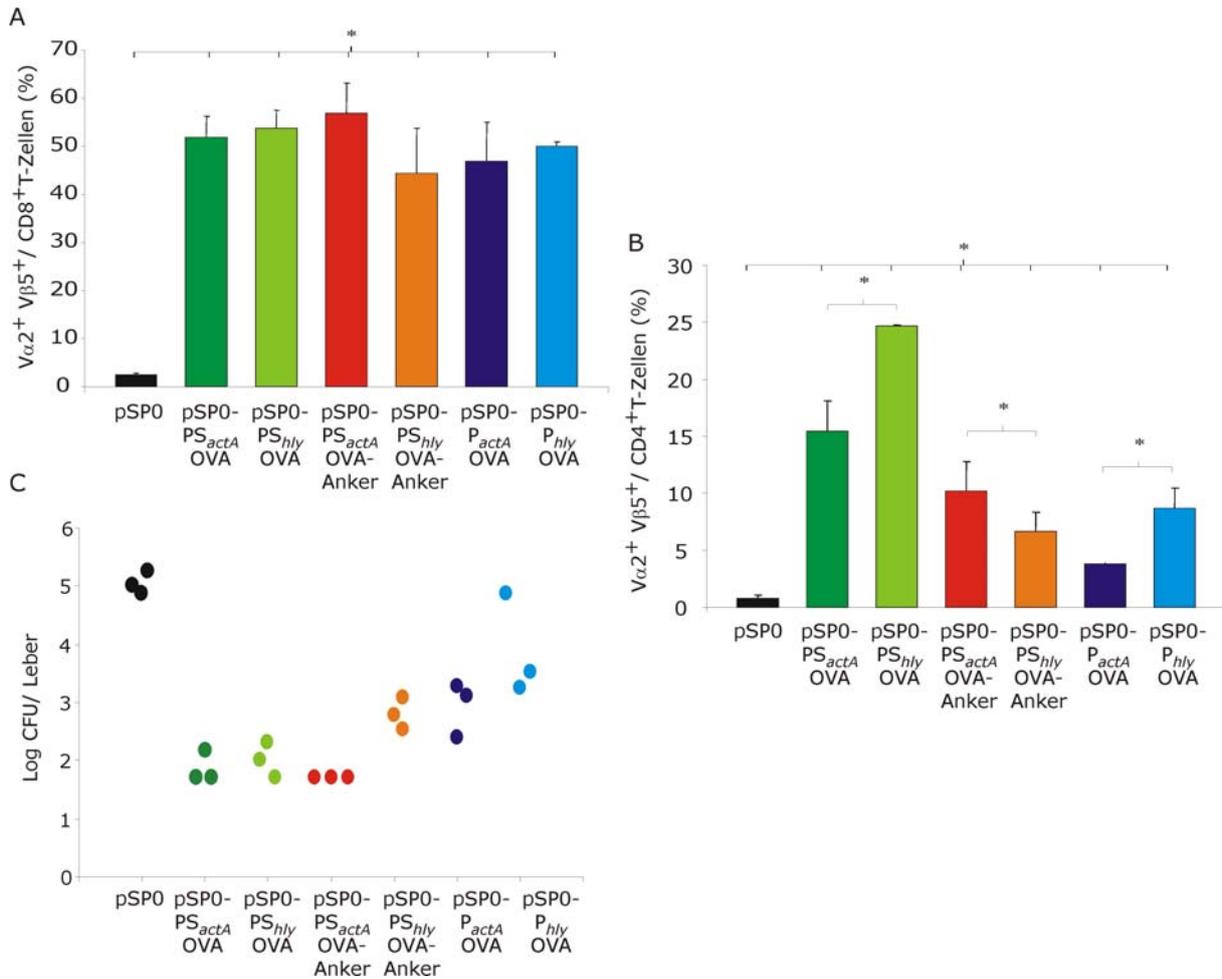


Abb. 5.41: Klonale Expansion der transferierten OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (A) und CD4⁺ T-Zellen (B) durch die *Lm* Trägerstämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ welche OVA als exportiertes (pSP0-PS_{actA}OVA, pSP0-PS_{hly}OVA), zellwandverankertes (pSP0-PS_{actA}OVA-Anker, pSP0-PS_{hly}OVA-Anker) oder intrazelluläres Protein (pSP0-P_{actA}OVA, pSP0-P_{hly}OVA) exprimieren. Der Stamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$ dient als Kontrollstamm. (C) Bakterienanzahl in Lebern von infizierten Mäusen am Tag 3 *p. i.*. Ein farbiges Kästchen repräsentiert eine Maus pro Gruppe. Ergebnisse stellen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen dar (n=3). Sternchen weisen auf signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe oder den einzelnen Stämmen untereinander (p<0,05, zweiseitiger stud. T-TEST).

Ebenfalls wurde die primäre Aktivierung von OVA-spezifischen CD4 T-Zellen im Haplotyp H-2K^d durch die oben genannten Stämme untersucht. Dafür wurden transgene DO11.10 Mäuse (BALB/c-Hintergrund) verwendet. Diese Mäuse erkennen mit ihrem TCR auf CD4 T-Zellen das Peptid OVA 323-339 im Kontext von MHC-Klasse II I-A^d. Dafür wurden Milzzellen aus den transgenen DO11.10 Mäusen gewonnen, 10⁷ Zellen davon in jede syngene Maus von 7 Versuchsgruppen transferiert (eine Versuchsgruppe bestand dabei aus 3 Mäusen). 24 h später wurde jede Mausgruppe jeweils mit einem der sechs OVA-exprimierenden *Lm* Stämmen $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{hly}OVA$ -Anker und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{hly}OVA$ und dem Kontrollstamm $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$ immunisiert. Drei Tage *p. i.* wurden die Milzzellen aus den Rezipientenmäusen isoliert und für durchflußzytometrische Analysen aufgearbeitet. In 2×10⁶ Milzzellen wurde durch Markierung mit dem Antikörpergemisch aus anti-CD4 und anti-Maus

DO11.10 TZR der prozentuale Anteil an transferierten CD4⁺ T-Zellen durchflußzytometrisch ermittelt.

Die erhaltenen proliferierenden CD4⁺ T-Zellen zeigten dieselbe Tendenz wie im vorher beschriebenen Versuch (Abb. 5.41, B), in dem OT-II transgene Milzzellen adoptiv transferiert wurden. Die einzige Änderung zum BL6-Hintergrund zeigte sich in den Zahlen der proliferierenden Zellen. Diese waren generell um 10 % niedriger (Abb.: 5.42).

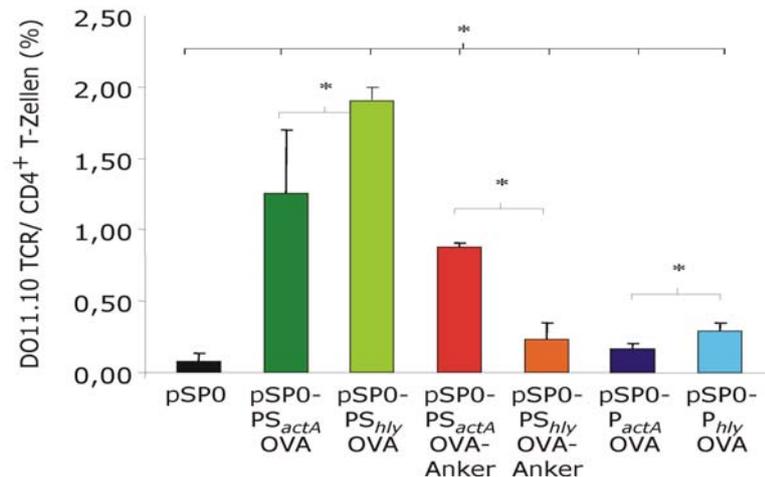


Abb. 5.42: Klonale Expansion der transferierten OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen durch die *Lm* Trägerstämme $\Delta(\text{trpS aroA aroB})$ welche OVA als exportiertes (pSP0-PS_{actA}OVA, pSP0-PS_{hly}OVA), zellwandverankertes (pSP0-PS_{actA}OVA-Anker, pSP0-PS_{hly}OVA-Anker) oder intrazelluläres Protein (pSP0-P_{actA}OVA, pSP0-P_{hly}OVA) exprimieren. Der Stamm $\Delta(\text{trpS aroA aroB})/\text{pSP0}$ dient als Kontrollstamm. Ergebnisse stellen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen dar (n=3). Sternchen weisen auf signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe oder den einzelnen Stämmen untereinander (p<0,05, zweiseitiger stud. T-TEST).

5.3 Konstruktion neuer virulenzattenuierter *Lm* Stämme als Vakzineträger

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, neue *Listeria monocytogenes* Deletionsmutanten zu generieren, um diese als Vakzineträger *in vivo* einzusetzen. Für *in vivo* Anwendungen ist es wichtig, *Lm* Stämme zu verwenden, die den Wirt zwar infizieren und das Vakzin in geeignete Wirtszellen einschleusen können, gleichzeitig aber keine krankmachenden Eigenschaften mehr besitzen. Vielmehr müssen ihre virulenten Eigenschaften, die den Wirtsorganismus schädigen würden, attenuiert sein.

In dieser Arbeit hatte man sich dazu entschlossen, die Gene *inIA*, *inIB* und *actA*, die an der Virulenz von *Lm* beteiligt sind, zu deletieren. Die Gene *inIA* und *inIB* kodieren für die Oberflächenproteine Internalin A (InIA) und Internalin B (InIB), welche die Internalisierung in nicht-phagozytische Zellen vermitteln [7, 302]. InIA besitzt dabei einen eingeschränkten Zelltropismus (z.B. CACO-2) aufgrund der spezifischen Interaktion mit humanen E-Cadherin, wohingegen InIB einen ausgeprägten Zelltropismus besitzt [181]. InIB vermittelt die Internalisierung in Hepatozyten, Fibroblasten und Epithelzellen. Das Oberflächenprotein ActA, das vom Virulenzgen *actA* kodiert wird, trägt ebenfalls zur Invasion in nicht-phagozytische Zellen bei [290], aber hauptsächlich rekrutiert es zelluläres Aktin, um intra- und interzelluläre Motilität zu ermöglichen, sobald sich Listerien im Zytosol der

Wirtszelle befinden [58]. *Lm* Stämme, die in diesen Genen *inIA*, *inIB* und *actA* mutiert wurden, zeigten eine Virulenzattenuation *in vivo*, wobei eine *actA*-Deletion zu einer höheren Virulenzattenuation und einer schnelleren Elimination in der BALB/c Maus führte als die Doppelmutante *InIA/B* [7]. Des Weiteren wurde durch eine Deletion des *inIB*-Genes in Studien gezeigt, dass die Leber in infizierten Mäusen weniger geschädigt war. Diese Mutante wurde auch schon erfolgreich in Vakzinestudien eingesetzt [33].

In den vorhandenen *Lm* Stämmen $\Delta(trpS, actA)/pflotrps$, $\Delta(trpS aroA aroB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS inIA)/pflotrps$ sollte zuerst *inIB* deletiert werden, um anschließend aus den neuen *Lm* Stämmen $\Delta(trpS aroA aroB inIB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS inIB)/pflotrps$ das Gen *actA* zu entfernen. Allen Mutanten ist der Ausgangsstamm *Lm* $\Delta trpS/pflotrps$ gemeinsam. Als Ausgangsstamm wurde *Lm* $\Delta trpS$ deshalb verwendet, da er Bestandteil des „balanced-lethal“ Plasmid-Systems ist, welches zu 100 % *in vivo* stabil ist. Dieses *Listeria* „balanced-lethal“ Plasmid-System wurde so konstruiert, dass das essentielle Gen *trpS* aus dem Chromosom entfernt und gleichzeitig auf einem Tc-haltigen Plasmid *in trans* komplementiert wurde. Ebenso wird durch Vorhandensein des essentiellen *trpS* Gens auf dem Plasmid (*pflotrps*) gewährleistet, dass dieses Plasmid stabil an seinem Träger gebunden bleibt und dass der Träger bei Verlust des Plasmides nicht mehr im Wirt überlebt [235].

In der vorliegenden Arbeit wurden die *Lm* Deletionsmutanten $\Delta(trpS inIB)/pflotrps$, $\Delta(trpS inIAB)/pflotrps$, $\Delta(trpS actA inIB)/pflotrps$, $\Delta(trpS aroA aroB inIB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS aroA aroB inIB actA)/pflotrps$ hergestellt, wobei aus Zeitgründen nur der Stamm $\Delta(trpS inIAB)/pflotrps$ näher als Vakzineträger charakterisiert wurde.

5.3.1 Konstruktion der *Lm* Deletionsmutanten $\Delta(trpS inIB)/pflotrps$, $\Delta(trpS inIAB)/pflotrps$, $\Delta(trpS actA inIB)/pflotrps$, $\Delta(trpS aroA aroB inIB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS aroA aroB inIB actA)/pflotrps$

Aus allen Deletionsmutanten wurden die entsprechenden Gene im Leserahmen durch homologe Rekombination mit Hilfe von Derivaten des temperatursensitiven, Em-haltigen Mutagenesplasmids pLSV1 deletiert (\rightarrow 4.2.7). Das Mutagenesplasmid pLSV1-*actA* wurde freundlicherweise von S. Pilgrim und die beiden Mutagenesplasmide pLSV1- $\Delta inIB_{6-627}$ ($\Delta inIA_{3-798}$) und pLSV1- $\Delta inIB_{6-627}$ (WT) von A. Frentzen zur Verfügung gestellt. Nachdem die Deletionsplasmide in die entsprechenden *Lm* $\Delta trpS/pflotrps$ Stämme transformiert und Em-positive Klone erhalten wurden, wurden diese Klone bei 42 °C kultiviert, um die erste Integration der Deletionsplasmide über homologe Rekombination ins Chromosom zu erreichen. Nach Überprüfung per PCR auf Integration wurden die positiven Integrierten solange (hier 6-8 Passagen) bei 30 °C in BHI ohne Selektionsdruck passagiert bis Em-sensitive, aber noch Tc-positive Klone (*pflotrps*) durch Ausplattieren auf den entsprechenden Platten zu finden waren. Diese Em-sensitiven, aber Tc-positiven Klone wurden zur weiteren Suche nach Deletionsmutanten per PCR ausgewählt.

Für den Nachweis der Deletion des Genes *inIB* und *actA* im *Lm* Genom wurden Primer ausgewählt, die komplementär zu den Bereichen sind, welche das zu deletierende Gen flankieren. Liegt eine *actA*-Deletion vor, so ergibt sich ein 981 bp großes PCR-Produkt (WT: 2891 bp) aus den Primern *actA-1* und *actA-4* (Abb.: 5.43, Bild 2, Spur 2; Bild 5, Spur 2). Ein 548 bp großes PCR-Produkt mit den Primern *deltainIBcheck* und *deltainIainIB2* (Abb.: 5.43, Bild 1: Spur 2, Bild 2: Spur 3, Bild 4: Spur 4 und Bild 5: Spur 5) ergibt sich bei der *inIB* Deletion (WT: 2411 bp).

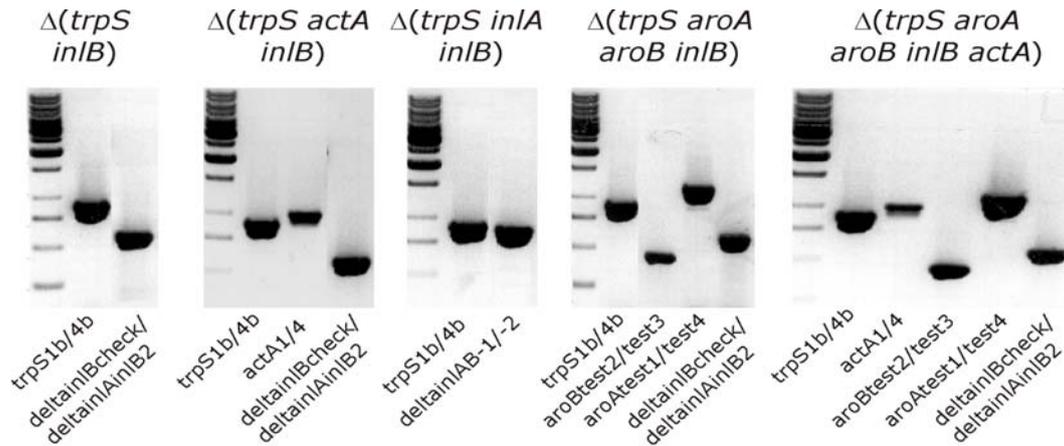


Abb. 5.43: Nachweis der Deletion der Gene *actA*, *aroA*, *aroB*, *inIAB*, *inIB*, und *trpS* per PCR in den neuen Mutanten $\Delta(\textit{trpS inIB})/\textit{pflotrps}$, $\Delta(\textit{trpS actA inIB})/\textit{pflotrps}$, $\Delta(\textit{trpS inIAB})/\textit{pflotrps}$, $\Delta(\textit{trpS aroA aroB inIB})/\textit{pflotrps}$ und $\Delta(\textit{trpS aroA aroB inIB actA})/\textit{pflotrps}$. Die verwendeten Primerpaare sind aufgeführt.

Für den Nachweis der *inIAB*-Deletion wurden die Primer *deltainIAB1* und *deltainIAB2* ausgewählt, welche in einer PCR Reaktion ein Fragment der Länge 890 bp (WT: 5141 bp) amplifizieren (Abb.:5.43, Bild 3: Spur 2). Zusätzlich wurden in den neuen Mutanten die ursprüngliche *trpS*-, *aroA*- und *aroB*-Deletion per PCR nachgewiesen. Die Ergebnisse für den Nachweis der *trpS*-Deletion sind in der Abb.: 5.42 in Spur 1 jeden Bildes und für die *aroA*- und *aroB*-Deletion in Spur 2 und 3 der Bilder 4 und 5 abgebildet. Bei einer *trpS*-Deletion mit den Primern *trpS1b* und *trpS4b* ergibt sich ein PCR-Produkt der Länge 0.8 kb anstatt des WT-Fragmentes von 2.2 kb. Für den Nachweis der *aroA*- und *aroB*-Deletion in einer PCR mit den Primerpaaren *aroAtest1* + *aroAtest4* und *aroBtest3* + *aroBtest2* werden die Fragmente der Größe 1177 bp und 400 bp amplifiziert.

Zusätzlich wurde die Deletion der Gene *actA*, *inIA* und *inIB* in den *Lm* Stämmen $\Delta(\textit{trpS inIB})/\textit{pflotrps}$, $\Delta(\textit{trpS inIAB})/\textit{pflotrps}$, $\Delta(\textit{trpS actA inIB})/\textit{pflotrps}$, $\Delta(\textit{trpS aroA aroB inIB})/\textit{pflotrps}$ und $\Delta(\textit{trpS aroA aroB inIB actA})/\textit{pflotrps}$ durch Sequenzierung bestätigt. Als Matrize für die Sequenzierungen diente isolierte chromosomale DNA aus den entsprechenden *Lm* Deletionsstämmen.

Die fertigen Deletionsmutanten $\Delta(\textit{trpS inIB})/\textit{pflotrps}$, $\Delta(\textit{trpS inIAB})/\textit{pflotrps}$, $\Delta(\textit{trpS actA inIB})/\textit{pflotrps}$, $\Delta(\textit{trpS aroA aroB inIB})/\textit{pflotrps}$ und $\Delta(\textit{trpS aroA aroB inIB actA})/\textit{pflotrps}$ wurden ebenfalls durch fehlende Expression der ActA-, InIA- und InIB-Proteine per Western Blot Analyse identifiziert. Dafür wurden alle relevanten Bakterienstämme bis zu einer optischen Dichte von 1.0 bei 600 nm in BHI kultiviert und anschließend wurden die intrazellulären Proteine nach Protokoll (→ 4.3.1) isoliert. In der Western Blot Analyse wurden die Zellextrakte aus den *Lm* Mutanten elektrophoretisch im SDS-Page aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und anschließend mit polyklonalen Antikörpern gerichtet gegen ActA, InIA und InIB dekoriert um sie anschließend durch Zusatz eines weiteren sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörpers chemilumineszierend auszuwerten.

In der nachfolgenden Abbildung sind die Western Blots der Deletionsmutanten $\Delta(trpS inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS inlAB)/pflotrps$, $\Delta(trpS actA inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS aroA aroB inlB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS aroA aroB inlB actA)/pflotrps$ zu sehen.

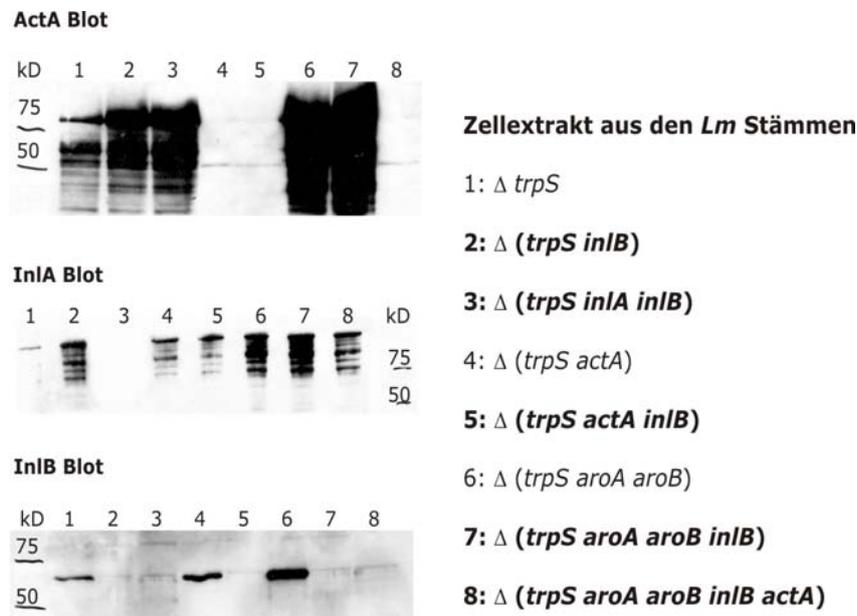


Abb.: 5.44: Nachweis der fehlenden Expression der Proteine ActA, InlA und InlB in den *Lm* Deletionsstämmen $\Delta(trpS inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS inlAB)/pflotrps$, $\Delta(trpS actA inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS aroA aroB inlB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS aroA aroB inlB actA)/pflotrps$ in der Western Blot Analyse mittels anti-ActA, anti-inlA und anti-inlB Kaninchenserum und dem sekundären Peroxidase gekoppelten anti-Kaninchen IgG Antikörper.

Eine fehlende Expression des Proteins InlA in der InlA-Mutante im InlA-Blot ist nachzuweisen. Das charakteristische Abbaubandenmuster des 80 kD schweren InlA-Proteins in der Mutante $\Delta(trpS inlAB)/pflotrps$ fehlt (Abb.: 5.44, InlA Blot, Spur 3). Auch eine fehlende Expression des 65 kD schweren InlB-Proteins konnte in den Mutanten $\Delta(trpS inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS inlAB)/pflotrps$, $\Delta(trpS actA inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS aroA aroB inlB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS aroA aroB inlB actA)/pflotrps$ dokumentiert werden (Abb.: 5.44, InlB-Blot, Spur 3, 5, 7 u. 8). Und schließlich konnte auch nachgewiesen werden, dass das ActA-Bandenmuster in den *Lm* Stämmen $\Delta(trpS actA inlB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS aroA aroB inlB actA)/pflotrps$ fehlt (Abb.: 5.44, ActA-Blot, Spur 5 u. 8). ActA besitzt zwar eine theoretische Größe von 70 kD, wandert aber immer bei > 90 kD im SDS-Page [34].

5.3.2 Einfluss der Deletion der Gene *actA*, *inlA* und *inlB* auf das Wachstumsverhalten

Um die konstruierten *Lm* Deletionsmutanten besser charakterisieren zu können, wurde untersucht, ob die Deletion der Gene *actA*, *inlA* und *inlB* das extrazelluläre und intrazelluläre Wachstumsverhalten der *Listerien* beeinflussen.

5.3.2.1 Das extrazelluläre Wachstum der Deletionsmutanten in BHI

Um das extrazelluläre Wachstumsverhalten dieser *Lm* Stämme $\Delta(trpS inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS inlAB)/pflotrps$, $\Delta(trpS actA inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS aroA aroB inlB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS aroA aroB inlB actA)/pflotrps$ zu charakterisieren, wurden alle Stämme parallel zu den jeweiligen isogenen WT Stämmen in BHI bei 37 °C angezogen. In regelmäßigen Abständen wurde dabei die optische Dichte

bei 600 nm bestimmt, um anschließend das Wachstum der Stämme als optische Dichte pro Zeit darstellen zu können (Abb.: 5.45).

Die neuen *Lm* Deletionsstämme $\Delta(trpS\ inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS\ inlAB)/pflotrps$, $\Delta(trpS\ actA\ inlB)/pflotrps$ zeigten ein gleiches Wachstumsverhalten, wie die dazugehörigen isogenen WT Stämme *Lm* $\Delta trpS/pflotrps$ und $\Delta(trpS\ actA)/pflotrps$. Auch das Wachstumsverhalten der neuen *Lm* Stämme $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB\ actA)/pflotrps$ stellte sich nicht anders dar, als das des isogenen WT Stammes *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pflotrps$.

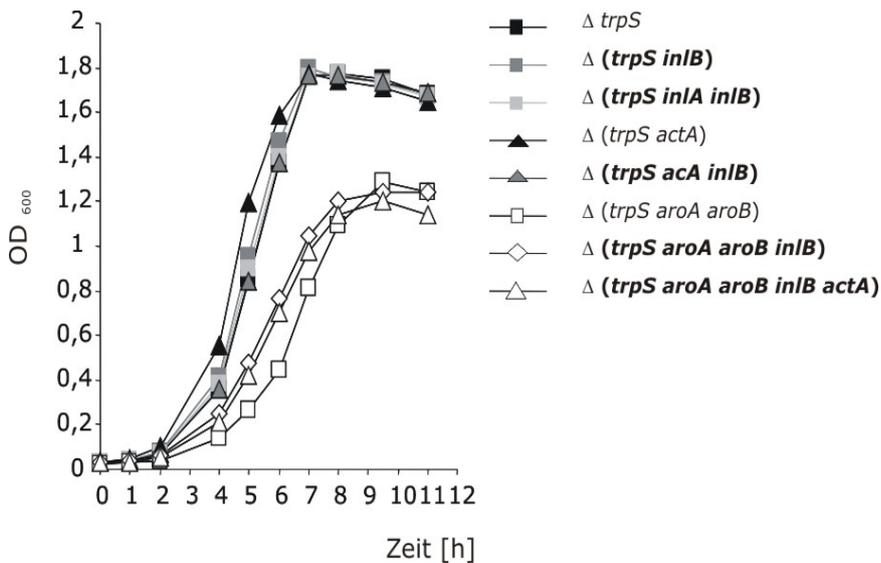


Abb. 5.45: Wachstumskurven der *Lm* Deletionsmutanten $\Delta(trpS\ inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS\ inlA\ inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS\ actA\ inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB\ actA)/pflotrps$ im Vergleich mit den dazugehörigen isogenen *Lm* Stämmen $\Delta trpS/pflotrps$, *Lm* $\Delta(trpS\ actA)/pflotrps$ und *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pflotrps$ in BHI.

Diese drei Stämme *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB)/pflotrps$, *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB\ actA)/pflotrps$ und *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pflotrps$ zeigten aber eine deutliche Wachstumsreduktion im Vergleich zu den vorherigen beschriebenen Stämmen *Lm* $\Delta(trpS\ inlB)/pflotrps$, *Lm* $\Delta(trpS\ inlAB)/pflotrps$ und *Lm* $\Delta(trpS\ actA\ inlB)/pflotrps$. Diese Wachstumsreduktion begründet sich aber auf der Deletion der Gene *aroA* und *aroB*, welche Gene darstellen, die Bestandteile der aromatischen Aminosäuren-Biosynthese kodieren. Das Fehlen dieser Bestandteile verursacht eine defiziente oxidative Respiration, welches zu einem verlangsamten Wachstum im BHI führt [289].

5.3.2.1 Das Wachstum der Deletionsmutanten *in vivo*

Um das intrazelluläre Wachstum der *Lm* Deletionsmutanten $\Delta(trpS\ inlB)/pflotrps$, $\Delta(trpS\ inlAB)/pflotrps$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB\ actA)/pflotrps$ *in vivo* zu bestimmen, wurden C57BL/6 Mäuse mit 5×10^3 CFU dieser Stämme *i.v.* infiziert. Drei Tage später wurden die Organe Milz und Leber den infizierten Mäusen entnommen und die Bakterien in diesen Organen durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt.

Wie in der nachfolgenden Abb. 5.46 zu sehen ist, weisen die *Lm* Deletionsmutanten $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB\ actA)/pflotrps$ eine deutliche Virulenzattenuation in Leber und Milz auf, da fast keine lebenden Bakterien in diesen Organen mehr gefunden wurden. Auch Mäuse, welche mit der *Lm* Deletionsmutante $\Delta(trpS\ inlAB)/pflotrps$ *i.v.* infiziert wurden, zeigten eine um 3 log verringerte Bakterienanzahl in Leber und eine 2 log verringerte Anzahl in Milz im Vergleich zu Mäusen, welche den WT $\Delta trpS/pflotrps$ appliziert bekommen hatten. Demnach ist diese Mutante in der Maus, wie auch schon in der Literatur beschrieben, virulenz-attenuiert.

Bemerkenswert ist allerdings, dass Mäuse, welche mit der *Lm* Deletionsmutante $\Delta(trpS\ inlB)/p\text{plotrps}$ infiziert wurden, vergleichbare Bakterienanzahlen in Leber und Milz aufwiesen wie die Mäuse, welche mit dem WT infiziert wurden. Theoretisch gesehen müssten geringere Mengen an Bakterien in Leberzellen gefunden werden, da es einer InlB-Mutante nicht mehr möglich ist, in Leberzellen wie Hepatozyten einzudringen [71, 108]. Gleichzeitig muß aber angemerkt werden, dass diese Lebern sehr blutreich waren.

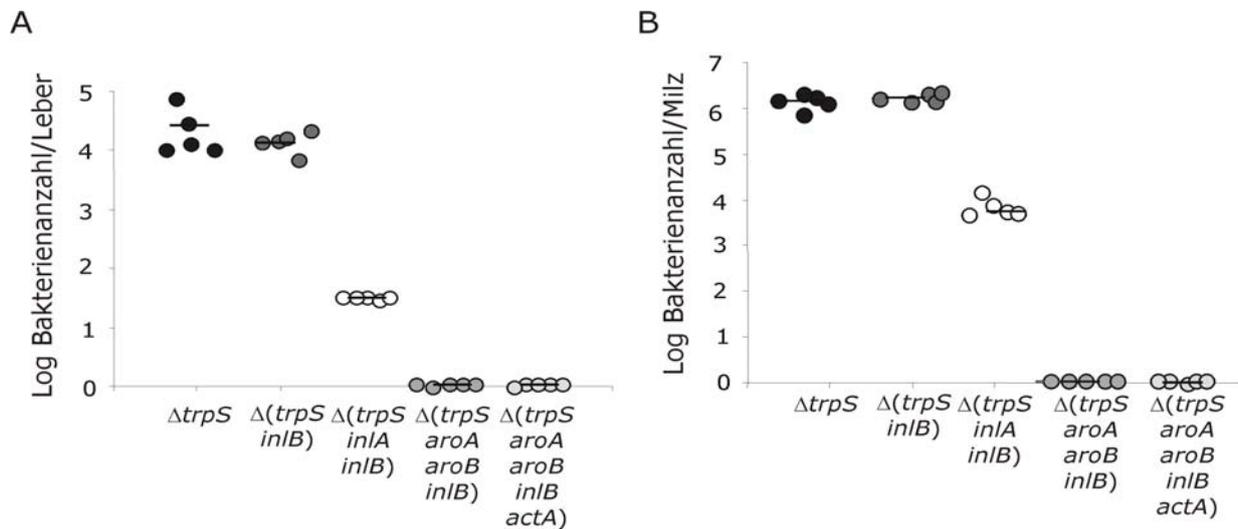


Abb. 5.46: Bakterienanzahlen in Leber und Milz am Tag 3 nach *i.v.* Infektion von C57BL/6 Mäuse mit 5×10^3 CFU der neuen *Lm* Deletionsmutanten $\Delta(trpS\ inlB)/p\text{plotrps}$, $\Delta(trpS\ inlA\ inlB)/p\text{plotrps}$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB)/p\text{plotrps}$ und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB\ inlB\ actA)/p\text{plotrps}$ im Vergleich zum WT $\Delta trpS$. Die Kreise entsprechen der lebenden Bakterienanzahl in dem Organ einer Maus. Mittelwerte der lebenden Bakterienanzahl einer Mausgruppe ($n=5$) sind in schwarzen Linien dargestellt.

5.3.3 Charakterisierung der Deletionsmutante *Lm* $\Delta(trpS\ inlAB)$ als Vakzineträger

Nachdem die Deletionsmutante *Lm* $\Delta(trpS\ inlAB)$ hergestellt wurde, sollte diese als Vakzineträger näher charakterisiert werden.

Aus *in vitro* Experimenten ist bekannt, dass die InlAB-Doppelmutante nicht in nicht-phagozytische Wirtszellen invadieren kann, da hauptsächlich die Internaline InlA und InlB die Invasion in diese Zellen vermitteln. Zwar können die kleinen Internaline zu einem geringen Prozentsatz diesen Verlust kompensieren, da ein kleiner Prozentsatz an verbleibender Invasivität einer InlAB Doppelmutante *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen wurde [86, 87, 7, 19]. Dennoch müsste eine InlAB-Mutante immer noch von phagozytierenden Zellen wie z. B. durch Makrophagen aufgenommen werden. Diesen Aspekt sollte indirekt in einem adoptiven Transferexperiment untersuchen werden, da im adoptiven Transferexperiment die phagozytierenden Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen, als Zielzellen angestrebt werden. Gleichzeitig sollte auch nachgewiesen werden, ob Listerien durch die Deletion der großen Internaline InlA und InlB immer noch einen effizienten Vakzineträger für das Modellantigen Ovalbumin darstellen.

Zuerst sollte bestätigt werden, dass die neue Deletionsmutante *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pflotrps$ nicht mehr in die nicht-phagozytierende CACO-2 Zelllinie invadieren kann. Wie in nachfolgender Abb. 5.47 zu sehen ist, konnte die *InlAB*-Mutante nicht mehr in CACO-2 Zellen eindringen.

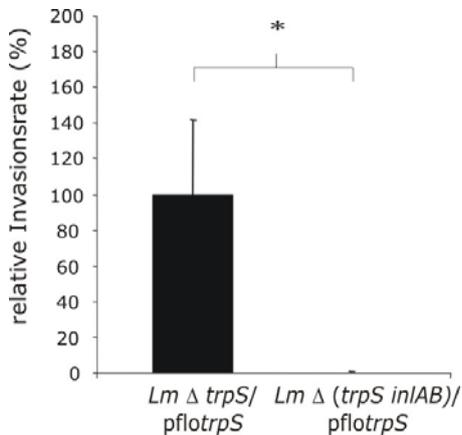


Abb. 5.47: Untersuchung der Invasionsfähigkeit des Stammes *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pflotrps$ im Vergleich zum WT Stammes *Lm* $\Delta trpS/pflotrps$ in CACO-2 Zellen. Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei durchgeführten Experimenten ist dargestellt. Sternchen gibt signifikantes Ergebnis nach stud. TTest wieder ($p < 0,05$).

Anschließend sollte die Effizienz dieses *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pflotrps$ Stammes als Überträger der EGFP-kodierenden Plasmid-DNA in P388.D1 Makrophagen *in vitro* untersucht werden. Erst nach erfolgreicher Aufnahme der Bakterien in die Wirtszellen und nach Transfer der Plasmid-DNA wird das EGFP-Protein, da es unter der Kontrolle des eukaryotischen Promotors P_{CMV} steht, von den Wirtszellen exprimiert. Zu diesem Zweck wurden die EGFP-kodierenden Plasmide pSP0- P_{CMV} EGFP und pSP118- P_{CMV} EGFP in den Stamm *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pflotrps$ transformiert und anschließend gegen das ursprüngliche Plasmid pflotrps ausgetauscht. Das Plasmid pSP118- P_{CMV} EGFP wurde deshalb verwendet, da in vorangegangenen Arbeiten festgestellt wurde, dass die Anwesenheit der Phagenlysinexpressionskassette P_{actA} -ply118 auf diesem Plasmid, und die daraus resultierende Autolysis der Bakterien, die Effizienz der Übertragung der Plasmid-DNA erhöht.

P388.D1 Makrophagen wurden in eine 12-Napfplatte ausgesät und 24 h später wurden diese mit den nicht-autolysierenden *Lm* Stämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP$ und $\Delta(trpS inlAB)/pSP0-P_{CMV}EGFP$ und den autolysierenden *Lm* Stämmen $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP$ und $\Delta(trpS inlAB)/pSP118-P_{CMV}EGFP$ in einer MOI von 5 infiziert und ein „Gentamicin-survival assay“ durchgeführt (\rightarrow 4.4.2.1.3). Am 1., 2., und 3. Tag nach Infektion wurden die Zellen am Durchflußzytometer auf das Vorhandensein von EGFP-exprimierenden Makrophagen ausgewertet. Eine vorherige Dokumentation der infizierten Makrophagen am Fluoreszenzmikroskop fand zusätzlich statt. Ebenso wurden auch gleichzeitig MTT-Tests (\rightarrow 4.6.2) zur Bestimmung der Vitalität der infizierten P388.D1 Makrophagen über einen Zeitraum von 3 Tagen durchgeführt.

Aus der Abb. 5.48, A ist ersichtlich, dass autolysierende Stämme effizienter die EGFP-kodierende Plasmid-DNA übertragen, da im Fluoreszenzmikroskop deutlich mehr EGFP-exprimierende Zellen in den infizierten Zellrasen mit diesen Stämmen dokumentiert wurden. Außerdem konnte im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden, dass der Stamm *Lm* $\Delta(trpS inlAB)$ besser als Überträger von Plasmid-DNA in Makrophagen geeignet ist als der WT Stamm *Lm* $\Delta trpS$, da mehr EGFP-exprimierende Zellen zu sehen waren. Verdeutlicht wird dies vor allem durch eine Anzahl von durchschnittlich 9 EGFP-exprimierenden Zellen in 3×10^5 Makrophagen, welche mit dem nicht-autolysierenden Stamm *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pSP0-P_{CMV}EGFP$ infiziert wurden im Vergleich zu 3 EGFP-exprimierenden Zellen in den mit *Lm* $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP$ infizierten Makrophagen. Die

Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden anschließend durchflußzytometrisch bestätigt (Abb. 5.48, B).

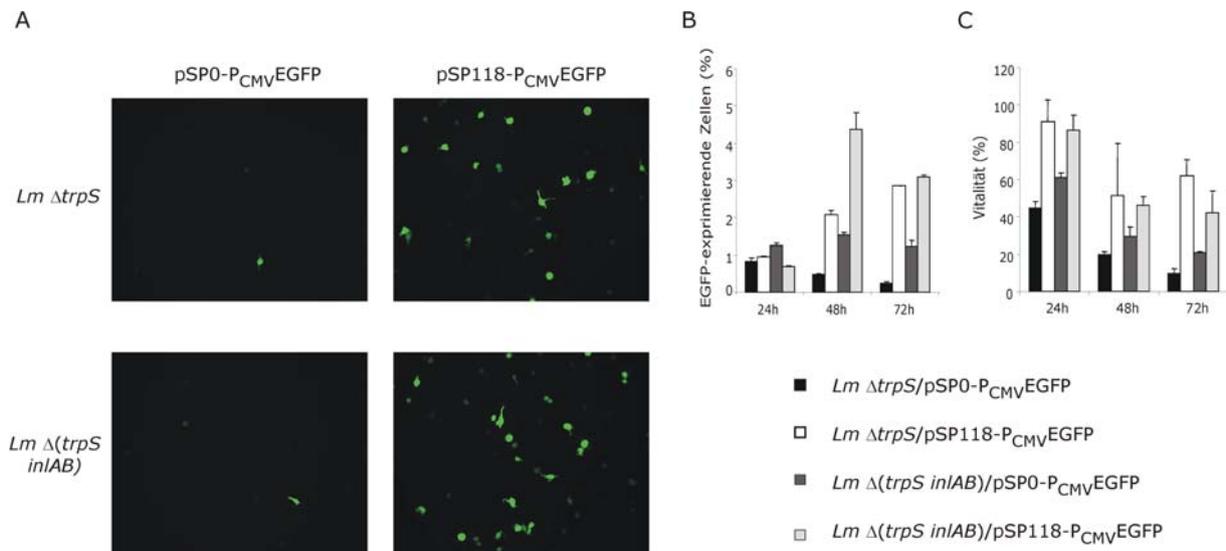


Abb. 5.48: Untersuchungen zur Effizienz des Stammes *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ als Überträger der EGFP-kodierenden Plasmid-DNA. Nachweis der EGFP-Expression in infizierten P388.D1 Makrophagen im Fluoreszenzmikroskop am Tag 1 (A) und im Durchflußzytometer nach 24h, 48h und 72h p. i. (B). (C) Vitalitätsbestimmung der P388.D1 Makrophagen nach Infektion mit dem Stamm *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ über den Zeitraum von 3 Tagen. P388.D1 Makrophagen wurden in einer MOI von 5 mit den relevanten EGFP-übertragenden Stämmen infiziert. Ein repräsentativer Versuch von zwei durchgeführten ist veranschaulicht.

Des Weiteren zeigte sich der Stamm *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ im MTT-Test als nicht so wirtszellschädigend wie der Stamm *Lm* $\Delta(trpS)$ (Abb. 5.48, C). Einen Tag nach Infektion waren noch 70 % der Zellen, welche mit dem Stamm *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ /pSP0-P_{CMV}EGFP infiziert wurden, vital, im Vergleich zu 45 % der Zellen, welche mit dem WT Stamm *Lm* $\Delta(trpS)$ /pSP0-P_{CMV}EGFP infiziert wurden. Der Zusatz der plasmidkodierte Phagenlysinexpressionskassette P_{actA}-ply118 in dieser Internalinmutante $\Delta(trpS inIAB)$ unterstützt sogar die Vitalität der infizierten Zellen um den Faktor 1,2. Dies konnte auch schon mit dem WT Stamm $\Delta(trpS)$ gezeigt werden [235].

Nachdem gezeigt werden konnte, dass dieser neue Stamm *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ sehr effizient die EGFP-kodierende Plasmid-DNA pSP118-P_{CMV}EGFP in Makrophagen übertragen hat, sollte er anschließend für die Übertragung eines heterologen Antigens in antigenpräsentierende Zellen mit nachfolgender Induktion einer Antigenpräsentation *in vivo* charakterisiert werden. Das Hühnereiweiß Ovalbumin wurde wieder als Modellantigen ausgewählt. Die vorhandenen OVA-Expressionsplasmide für das „Protein-“, „DNA-“ und „mRNA-Delivery“ wurden in den Stamm *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ /pflotrpS transformiert und gegen das ursprüngliche Plasmid pflotrpS ausgetauscht. Bevor *in vivo* Experimente mit diesen OVA-übertragenden Stämmen durchgeführt wurden, wurde untersucht, ob die OVA-Expressionsplasmide das extrazelluläre Wachstum dieser Stämme im Vollmedium BHI beeinflussen.

Dafür wurden die jeweiligen Stämme *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ /pSP118, *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ /pSP118-P_{actA}OVA, *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ /pSP118-P_{CMV}OVA und *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ /pCSA1+pCSB-OVA bei 37 °C in

BHI-Medium im doppelten Ansatz nach Protokoll kultiviert und Wachstumskurven erstellt (→ 4.2.6). Alle Stämme zeigten, dieselbe Tendenz wie die entsprechende WT Stämme *Lm* $\Delta trpS$ mit den OVA-Expressionsplasmiden (→ 5.1.1.2.2).

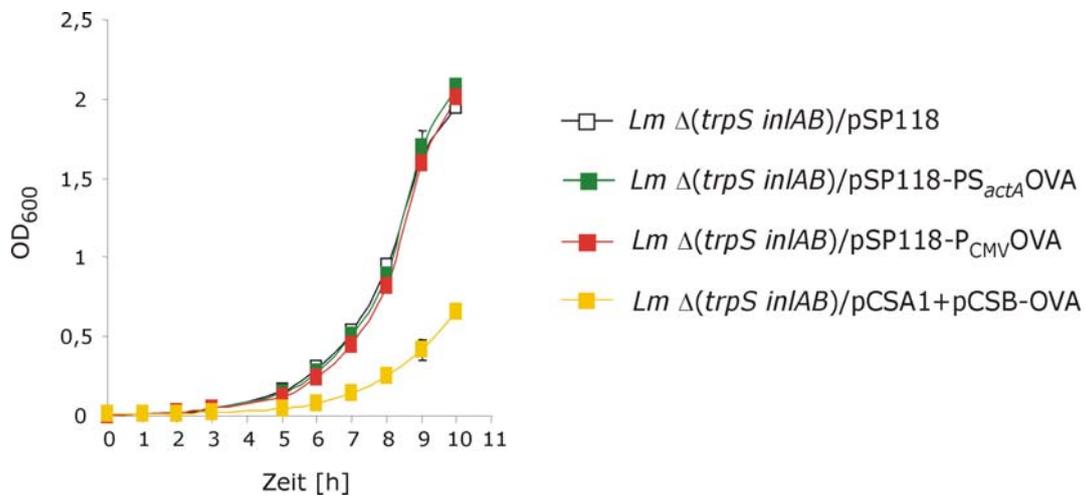


Abb. 5.49: Wachstumskurven der *Lm* Stämme mit den jeweiligen OVA-Expressionsplasmiden im BHI Medium. „RNA-Delivery“-Stamm, *Lm* $\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$; „DNA-Delivery“ Stamm, *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pSP118-P_{CMV} OVA$; „Protein-Delivery“ Stamm *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pSP118-PS_{actA} OVA$; Kontrollstamm *Lm* $\Delta trpS/pSP118$. Die optische Dichte der Kulturen wurde bei 600 nm gemessen. Das dargestellte Ergebnis repräsentiert einen von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsansatz.

Die *Lm* $\Delta(trpS inlAB)$ Stämme, die die Plasmide $pSP118-P_{CMV} OVA$ oder $pSP118-PS_{actA} OVA$ enthalten, welche für die Übertragung von Ovalbumin als plasmidkodierte DNA oder als Protein fungieren, zeigten ein ähnliches extrazelluläres Wachstumsverhalten bei Kultivierung im BHI-Medium wie der WT Stamm *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pSP118$ ohne OVA-Expressionsplasmid (Abb. 5.49). Dagegen wies der Stamm *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pCSA1+pCSB-OVA$, der die OVA-mRNA überträgt, ein reduziertes Wachstum im BHI-Medium auf.

Anschließend wurden die erhaltenen Stämme *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pSP118-PS_{actA} OVA$, *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pSP118-P_{CMV} OVA$, *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pSP118$, *Lm* $\Delta trpS hly inlAB/pCSA1+pCSB1$ und *Lm* $\Delta(trpS inlAB)/pCSA1+pCSB-OVA$ in adoptive Transferexperimente eingesetzt, um eine primäre Aktivierung von MHC-Klasse-I-restringierte $CD8^+$ T-Zellen nachzuweisen. Wie vorher schon beschrieben wurde, ist die Doppelmutante *InlAB* virulenzattenuiert. Deshalb wurden C57BL/6 Rezipientenmäuse einen Tag nach adoptivem Transfer von 1×10^7 OT-I Milzzellen mit diesen *Lm* Stämmen in einer CFU von 5×10^7 infiziert. Drei Tage später wurde die Häufigkeit der transferierten OT-I Zellen mit einem Gemisch aus Antikörpern gerichtet gegen die Oberflächenantigene CD8, $V\alpha 2$ und $V\beta 5$ durchflußzytometrisch bestimmt.

Ebenso wurde die Bakterienzahl am Tag 4 in den C57BL/6 Rezipientenmäusen durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen der Leberhomogenisate bestimmt.

Eine klonale Expansion an transferierten OT-I Zellen und damit eine primäre Aktivierung von OVA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen über den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg konnte nur in den Mausgruppen nachgewiesen werden, welche mit Listerien infiziert wurden, die Ovalbumin als Protein exportierten oder als plasmidkodierte mRNA übertrugen (Abb.: 5.50, A).

Dabei stellt wiederum das „Protein-Delivery“, die effizienteste Strategie (41,36% OVA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der gesamten CD8⁺ T-Zellpopulation versus 8,14 % („RNA-Delivery“) dar, um OVA zu übertragen. Die Ergebnisse waren vergleichbar den Ergebnissen mit den isogenen Trägerstämmen *Lm* Δ *trpS*.

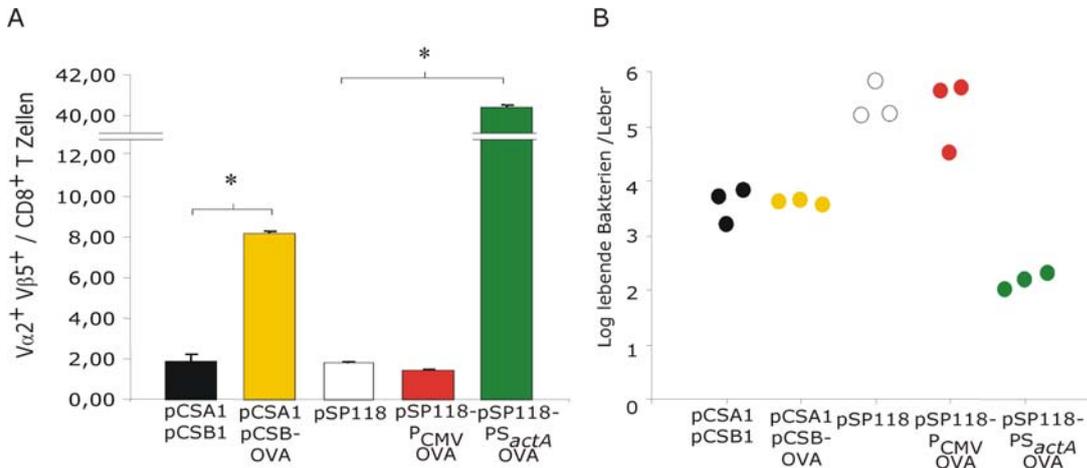


Abb. 5.50: (A) Klonale Expansion der transgenen CD8⁺ T-Zellen nach Infektion mit *Lm* Δ (*trpS inlAB*) Stämmen, welche die verschiedenen OVA-Expressionsplasmide übertragen. Einen Tag vor Infektion wurden 10⁷ Milzzellen aus OT-I Mäusen in C57BL/6 Mäuse transfertiert. Drei Tage nach Infektion wurde die Häufigkeit an V α 2⁺ und V β 5⁺ Zellen unter allen CD8⁺ T-Zellen bestimmt um eine MHC-Klasse-I restringierte OVA Präsentation nachzuweisen. (B) Bestimmung der lebenden Bakterienanzahl in den Lebern der infizierten Mäuse 4 Tage nach adoptiven Transfer. *Lm* Δ (*trpS inlAB*)/pCSA1+pCSB1 und *Lm* Δ (*trpS inlAB*)/pSP118 sind Kontrollstämme. *Lm* Δ (*trpS inlAB*)/pCSA1+pCSB-OVA setzt die OVA-mRNA, *Lm* Δ (*trpS inlAB*)/pSP118-PCMV-OVA die OVA-DNA und *Lm* Δ (*trpS inlAB*)/pSP118-PS_{actA}OVA die OVA-Proteine frei. Die dargestellten Kreise entsprechen der Bakterienanzahl in der Leber einer Maus pro Gruppe. Ergebnisse sind Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen (n=3) und repräsentieren ein Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen. Sternchen weisen auf signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe (p<0,05, zweiseitiger stud. T-TEST).

Eine deutlich signifikante verringerte Bakterienzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden nur in den Lebern der Mäuse gefunden, welche mit dem Protein-übertragenden Stamm *Lm* Δ (*trpS inlAB*)/pSP118-PS_{actA}OVA infiziert wurden. Alle anderen Bakterienzahlen entsprachen den Anzahlen der Bakterien in den Lebern der infizierten Mäuse mit den Kontrollstämmen *Lm* Δ (*trpS inlAB*)/pSP118 und *Lm* Δ (*trpS inlAB*)/pSCSA1+pCSB1 (Abb. 5.50, B).

Demnach ist trotz der Deletion der Virulenzgene *inlA* und *inlB*, welche die wichtigsten Oberberflächenproteine für die Internalisierung in nicht-phagozytische Zellen kodieren, diese Mutante sehr gut als Vakzineträger einsetzbar.

5.4 Entwicklung alternativer autolysierender *Lm* Stämme für die Baktinfektion

Ein letztes Ziel der Doktorarbeit sollte die Konstruktion neuer autolysierender *Lm* Stämme für die Baktinfektion sein. Die bisher angewandte Autolysisstrategie beruht auf der hydrolytischen Funktion der Endopeptidase des *Lm*-spezifischen Phagens A118. Dieses genannte Phagenlysin Ply118 wurde

unter der Kontrolle des *actA*-Promotors kloniert [67], der vom Transkriptionsaktivator PrfA abhängig ist und vorwiegend erst im Zytosol von eukaryotischen Zellen aktiv wird. Dadurch erfolgt die Autolysis der Listerien erst hauptsächlich im Zytosol. Das Ziel dieser Strategie war, dass durch die Autolysis Plasmid-DNA ins Zytosol freigesetzt werden kann, welche eine Expressionskassette eines Modellproteins oder Antigens kodiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass das bisher verwendete Autolysissystem durch das Phagenlysin 118 (Ply118) einen entscheidenden Nachteil besitzt, um diese autolysierenden Stämme als effiziente Impfstoffvektoren einsetzen zu können. Dieses System unterstützt *in vitro* zwar eine erhöhte Freisetzung von Transferplasmiden für DNA [235] oder mRNA [266] in fast allen Wirtszellen und *in vivo* die Freisetzung des Modellproteins Ovalbumins (→ 5.1.1.3). Außerdem zeigte eine orale [235, 266] oder auch intravenöse Applikation (→ 5.1.1.2.5) dieser autolysierender Stämme eine geringere Anzahl an lebenden Bakterien im Vergleich zu nicht-autolysierenden Stämmen in den Organen Leber und Milz. Aber nachteilig ist, dass bei einer Applikation einer viermal höheren Dosis dieses Stammes als bei dem nicht-autolysierenden WT Stamm ein Wachstum dieser autolysierenden Stämme in den infizierten Tieren nachgewiesen wurde (→ 5.1.1.2.5). Dieses Wachstum ist aber unvorteilhaft für den Einsatz dieser Stämme als effiziente Impfstoffträger. Deshalb sollte ein neues Autolysissystem auf der Basis attenuierter Listerien im Rahmen einer Kooperationsarbeit mit M. Loessner entwickelt werden, mit dem Ziel, dass nach der Autolyse zwar ausreichende Mengen an Plasmid-DNA oder mRNA in Wirtszellen übertragen wird, aber möglichst wenige Bakterien intrazellulär überleben.

Um das neue Autolysissystem zu verwirklichen, sollte das zweite Protein des Phagen A118, das im Infektionszyklus des Phagen auch zur Lysis des Bakteriums beiträgt, verwendet werden. Dieses Protein, das Holin 118 (Hol118), stellt ein Membranprotein dar, welches Poren in der bakteriellen Zellwand durch Homooligomerisierung bildet. Durch diese Poren gelangt anschließend das Ply118 an sein Substrat in der Peptidoglykanschicht und lysiert durch seine L-Alanoyl-D-Glutamat-Spezifität die bakterielle Zellwand [191, 189, 305].

Für die Verwirklichung der neuen Autolysisstrategie wurde die kodierende Gensequenz des Holins einmal allein und auch die Kombination aus den kodierenden Gensequenzen Holin und Phagenlysin, wie sie wildtypisch im Phagen zu finden sind, unter der Kontrolle des *actA*-Promotors in das vorhandene „balanced-lethal“ Plasmid-System kloniert (P_{actA} -*hol*118, P_{actA} -*holply*118).

C. Moritz klonierte 2005 im Rahmen seines Fortgeschrittenen-Praktikums II zusätzlich zwei weitere Lysiskassetten. Bei diesen wurde die kodierende Sequenz des Holins oder die Kombination der kodierenden Sequenzen *hol*118 und *ply*118 unter der Kontrolle des *hpt*-Promotors kloniert (P_{hpt} -*hol*118, P_{hpt} -*holply*118). *Hpt* kodiert für den Transporter für phosphorylierte Hexosen und Ribosen, dessen Promotor PrfA-abhängig aktiviert wird und im Zytosol von eukaryotischen Zellen aktiv ist [46]. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass dieser *hpt*-Promotor im Vergleich zum *actA*-Promotor extrazellulär kaum aktiviert wird. Demnach sollten die neuen Lysiskassetten P_{hpt} -*hol*118 und P_{hpt} -*holply*118 erst sehr viel später (~ 6 h nach Eintritt) (persönliche Mitteilung M. Beck, B. Joesepp) im Zytosol exprimiert werden.

5.4.1 Konstruktion der alternativen autolysierenden *Lm* Stämme

Die vier Expressionskassetten P_{actA} -*hol*118, P_{actA} -*holply*118, P_{hpt} -*hol*118 und P_{hpt} -*holply*118 wurden in das Ausgangsplasmid pSP0- P_{CMV} EGFP2 kloniert, um die Wirkung der neuen Phagenlysinkassetten

zusammen mit dem „balanced lethal“ Plasmid-System $\Delta trpS/pflotrps$ im Vergleich zur bisher angewandten Autolysisstrategie zu testen ($\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP$).

Die Klonierungen der neuen vier Expressionsplasmide ist nachfolgend erläutert: Für die Klonierung des Holins in das Ausgangsplasmid pSP0- $P_{CMV}EGFP2$ wurde die *hol118*-kodierende Sequenz aus der chromosomalen DNA des Phagen A118 mit den Primern *hol(b)* und *hol(R)* amplifiziert, mit dem durch die beiden Primer *PactA(F)* und *hol(a)* gewonnenen Promotorfragment P_{actA} in einer zweiten PCR-Reaktion homolog rekombiniert. Anschließend wurde das Fusionsprodukt aus *actA*-Promotor und *hol118*-Gensequenz durch die Primer *PactA* und *hol(R)* in einer dritten PCR-Reaktion vervielfältigt. Diese 599 bp große Expressionskassette P_{actA} -*hol118* wurde mit *Cfr9I*-linearisierten pSP0- $P_{CMV}EGFP2$ ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pSP14- $P_{CMV}EGFP2$ (Abb. 5.51, A).

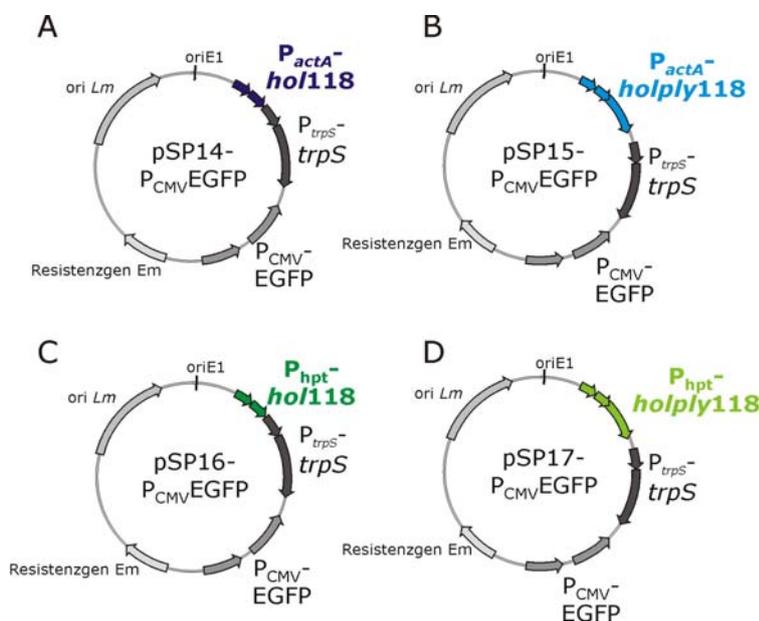


Abb. 5.51: Schematische Darstellung der Gentransferplasmide pSP14- $P_{CMV}EGFP2$ (A), pSP15- $P_{CMV}EGFP2$ (B), pSP16- $P_{CMV}EGFP2$ (C) und pSP17- $P_{CMV}EGFP2$ (D). Der Unterschied zwischen den einzelnen Plasmiden besteht in der Lysis-Expressionskassetten, die farblich hervorgehoben sind. *ori Lm*, Replikationsursprung für *Listeria*; *ori E1*, Replikationsursprung für *E. coli*; *trpS*, essentielles Gen von *Lm* kodiert unter Kontrolle des eigenen Promotors; *Em*, Resistenzgen; P_{CMV} -EGFP, eukaryotische Expressionskassette für EGFP.

Parallel dazu wurde die Expressionskassette P_{actA} -*holply118* (1444 bp) ebenfalls durch homologe Rekombination erstellt. Die Primer *PactA(F)* und *hol(A)* amplifizierten den *actA*-Promotor und die Primer *hol(B)* und *ply(R)* das Kombinationsprodukt *holply118*. Die beiden erhaltenen Fragmente wurden fusioniert und in einer dritten Reaktion mit den zwei äußeren Primern *PactA(F)* und *ply(R)* vervielfältigt. Das entstandene rekombinierte Fragment P_{actA} -*holply118* wurde ebenfalls mit *Cfr9I* verdaut und mit dem linearisierten Vektor pSP0- $P_{CMV}EGFP2$ ligiert, resultierend im Plasmid pSP15- $P_{CMV}EGFP2$ (Abb.: 5.51, B).

Die Expressionskassetten P_{hpt} -*hol118* (546 bp) und P_{hpt} -*holply118* (1391 bp) wurden ebenfalls durch homologe Rekombination kloniert und mit *Cfr9I* verdaut. Die resultierenden Plasmide pSP16- $P_{CMV}EGFP2$ und pSP17- $P_{CMV}EGFP2$ (Abb.: 5.51, C u. D) entstanden durch Ligation der *Cfr9I*-verdauten Expressionskassetten mit dem *Cfr9I*-linearisierten Vektor pSP0- $P_{CMV}EGFP2$.

Alle vier Gentransferplasmide wurden in den *Lm* Stamm $\Delta trpS/pflotrps$ transformiert (\rightarrow 4.2.3.2) und durch Plasmidaustausch mit dem ursprünglichen Plasmid *pflotrps* (\rightarrow 4.2.5) wurden die neuen autolysierenden Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ erhalten.

5.4.2 Charakterisierung der alternativen autolysierenden *Lm* Stämme

5.4.2.1 Extrazelluläres Wachstum der Stämme

Die neuen autolysierenden *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ wurden im Vergleich mit dem autolysierenden *Lm* Stamm $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$ und dem nicht-autolysierenden WT *Lm* Stamm $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ in je zwei Ansätzen in BHI Medium angezogen. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte der einzelnen Kulturen bei 600 nm bestimmt, um anschließend Wachstumskurven erstellen zu können (Abb.: 5.52).

Das Wachstum der neuen Stämme unterscheidet sich nicht vom Wachstum der beiden Kontrollstämme *Lm* $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und *Lm* $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$. Demnach scheinen die neuen Lysiskassetten $P_{actA-hol118}$, $P_{actA-holply118}$, $P_{hpt-hol118}$ und $P_{hpt-holply118}$ im Vollmedium BHI stabil zu sein.

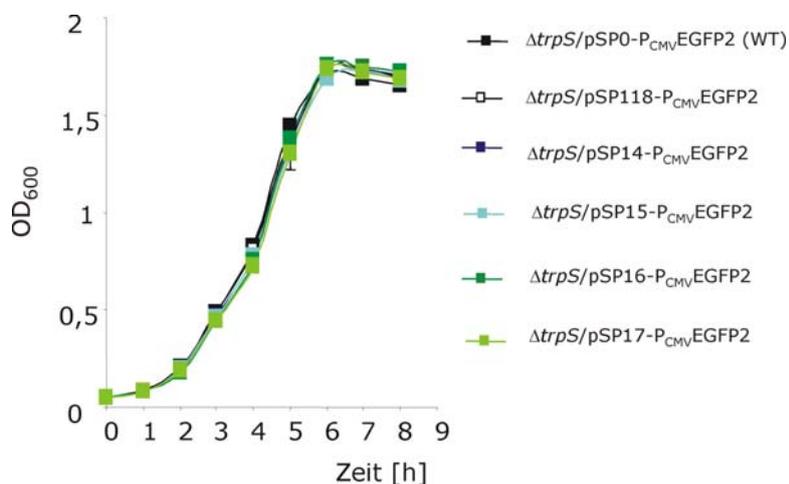


Abb. 5.52: Wachstumskurven der *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ im Vollmedium BHI. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die optische Dichte bei 600 nm der Kulturen bestimmt.

5.4.2.1 Wachstum und intrazelluläres Verhalten der neuen autolysierenden Stämme in der CACO-2 Zelllinie

Das intrazelluläre Verhalten der alternativen Autolysisstämme wurde in CACO-2 Zellen untersucht. Dafür wurden zwei Infektionsversuche durchgeführt. Im ersten Infektionsversuch wurden die ausgesäten CACO-2 Zellen mit den *Lm* Stämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ und im zweiten mit den *Lm* Stämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ infiziert. Dazu wurden alle Stämme bis zu einer optischen Dichte von 1,0 bei 600 nm in BHI kultiviert, einmal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend im gleichem Volumen isotonischer Kochsalzlösung incl. 20 %-Glycerol bei 80 °C bis zum Gebrauch gelagert. Für die Infektion wurden die einzelnen Stämme auf eine MOI von 5 eingestellt und damit wurden CACO-2 Zellen im Dreifachansatz für eine Stunde infiziert. Nach einem anschließenden Waschschrift wurden alle Infektionsansätze mit 100 µg/ml Gentamycin im Kulturmedium behandelt. Nach einer Stunde wurde die Infektion in einem Teil der Ansätze für jeden Stamm gestoppt, die CACO-2 Zellen lysiert und die Anzahl an Bakterien durch Ausplattieren geeigneter

Verdünnungsstufen bestimmt. Die verbleibenden Infektionsansätze wurden mit einer geringeren Konzentration an Gentamycin (15 µg/ml) weiter behandelt, um zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Lebendanzahl an Bakterien in den Infektionsansätzen eines jeden Stammes auszuplattieren. Wie in Abb.: 5.53 zu sehen ist, zeigten die beiden Kontrollstämme $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$ ein ähnliches Invasionsverhalten, dagegen konnten bei den beiden Stämmen mit den alternativen Lysiskassetten $P_{actA-hol118}$ und $P_{actA-plyhol118}$ eine Stunde nach Gentamycinzugabe nur 0.01 % intrazelluläre Bakterien in Relation zum WT $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$, dem Stamm ohne Lysiskassette, detektiert werden.

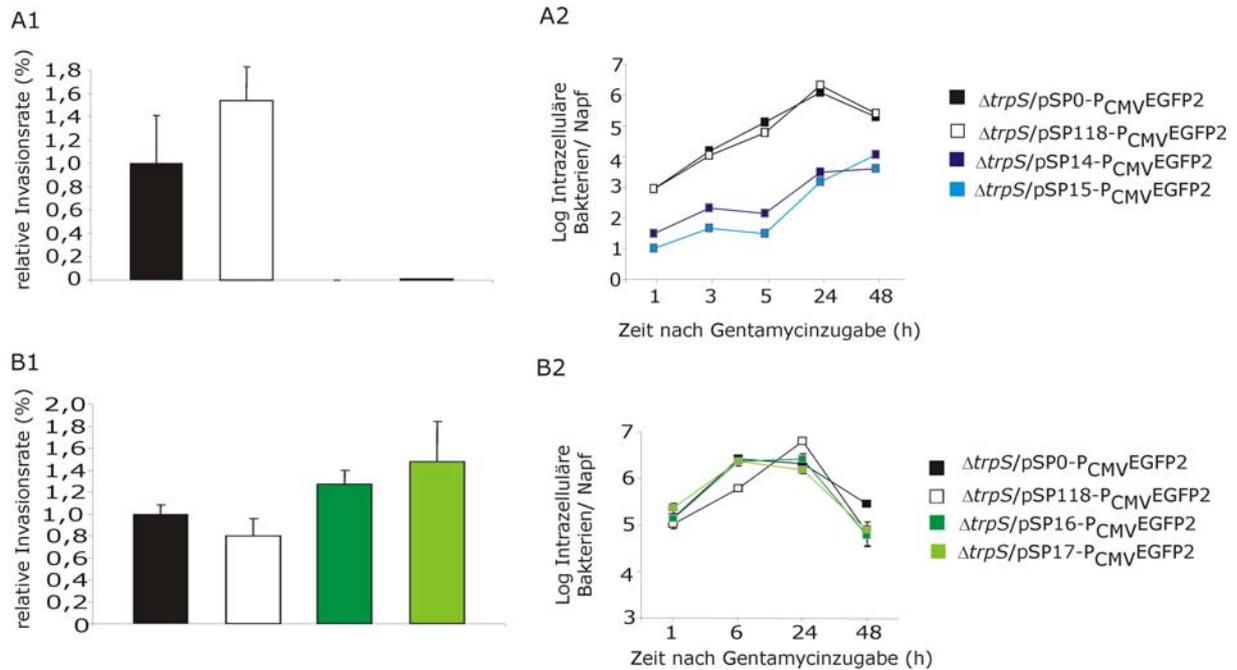


Abb. 5.53: Invasion (A1, B1) und Replikation (A2, B2) der *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ (A), $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ (B) in Vergleich zu den Kontrollstämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$ in CACO-2 Zellen. Die Zellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde die Infektion gestoppt und die intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt.

Die wenigen Bakterien der Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$, die in die Wirtszelle eindringen, replizierten in den ersten Stunden fast gar nicht intrazellulär, erst nach 5 Stunden nach Gentamycinzugabe wurde ein Anstieg der Bakterienzahlen in den Wirtszellen im Vergleich zu den Kontrollstämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$ nachgewiesen. Dagegen wurde ein Wachstum der intrazellulären Bakterien des WT Stammes $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und des Stammes $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$, welcher die bisher angewandte Lysiskassette $P_{actA-ply118}$ trägt, im Verlauf von 48 Stunden nach Gentamycinzugabe beobachtet.

Im Gegensatz zu den beschriebenen *Lm* Stämmen $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ wurden die beiden anderen *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$, welche die Kassetten $P_{hpt-hol118}$ und $P_{hpt-holply118}$ trugen, in den CACO-2 Zellen im gleicher Anzahl wie der WT gefunden. Des Weiteren replizierten sie genauso wie die Kontrollstämme $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$ intrazellulär und nach 24

Stunden nach Gentamycinzugabe schien eine Lyse dieser Bakterien einzusetzen, da die Bakterienzahlen in den 48 h-Ansätzen deutlich geringer waren. Im Vergleich dazu wurde kein Rückgang in den Bakterienzahlen der vorher beschriebenen Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ verzeichnet.

Die replikative Vermehrung der Stämme $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ konnte auch sehr gut mit Giemsa-Färbungen infizierter CACO-2 Zellen veranschaulicht werden (Abb.: 5.54). Giemsa-Färbungen wurden 6 und 24 Stunden nach Infektion durchgeführt, indem der Zellrasen fixiert und anschließend mit der Giemsa-Lösung für 30 min angefärbt wurde. Danach wurde ausgiebig gewaschen und schließlich wurden die trockenen Präparate unter dem Mikroskop dokumentiert. 6 Stunden nach Infektion konnten nur sehr vereinzelt Bakterien nachgewiesen werden, wohingegen nach 24 Stunden der gesamte Zellrasen mit den Bakterien $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ besiedelt war. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die verschiedenen Lysiskassetten, die unter der Kontrolle des *hpt*-Promotors stehen, nicht für eine zuverlässige intrazelluläre Abtötung der Bakterien ausreichend sind.

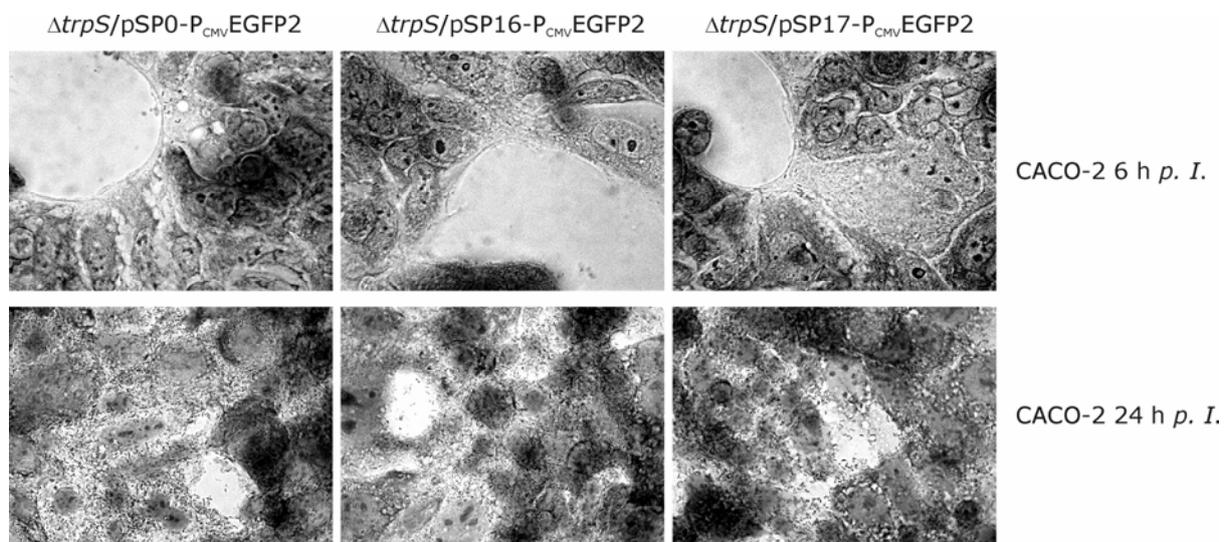


Abb. 5.54: Giemsa-Färbungen von CACO-2 Zellen, welche mit den Listerien $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ und dem Kontrollstamm $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ infiziert wurden.

Zur Beurteilung warum fast gar keine *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ in CACO-Zellen gefunden wurden, wurden zusätzliche Infektionsassays mit diesen im Vergleich zu den Kontrollstämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$ in CACO-2 Zellen durchgeführt. In diesen Zellkulturexperimenten sollte nachgewiesen werden, ob eine Lysis der beiden Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$, welche die Kassetten $P_{actA-hol118}$ und $P_{actA-holply118}$ tragen, schon bei Zellkontakt ausgelöst wird. Durch Untersuchungen hat man bereits herausgefunden, dass sich ActA an der Invasion in Epithelzellen beteiligt und dass dadurch der *actA*-Promotor durch das PrfA bereits bei Zellkontakt aktiviert wird [290]. Um herauszufinden, ob auch hier durch die gleiche Art und Weise der *actA*-Promotor bei Zellkontakt aktiviert wird und es dadurch noch außerhalb der Zelle zur Expression der Phagengene und damit zur verfrühten Autolysis kommt, wurde der nachfolgende Infektionsassay durchgeführt. CACO-2 Zellen wurden mit den *Lm* Stämmen $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$,

$\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP$ in einer MOI von 5 infiziert. Damit möglichst nur die oberflächenassoziierten Bakterien in der Messung erfasst wurden, wurde die Infektionszeit auf 30 min gekürzt. Auf diese Art und Weise sollte erreicht werden, dass die Bakterien noch nicht vollständig in CACO-2 Zellen eingedrungen sind. Des Weiteren wurde durch das Weglassen von Gentamycin und durch 5 gründliche Waschgänge des infizierten Zellrasens erreicht, das letztendlich nur adhärende und möglichst wenige intrazelluläre Bakterien in die Auswertung mit eingingen.

In nachfolgender Abb. 5.55 ist zu sehen, das durch den Infektionsassay „Lyse bei Zellkontakt“ deutlich weniger Bakterien der Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ im Vergleich zu den beiden Kontrollstämmen $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP$ und $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ in den Infektionsansätzen gefunden wurden. Auch der Stamm $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP$, welcher die Lysiskassette $P_{actA-}ply118$ trägt zeigte schon eine verminderte Anzahl (4×10^4 statt 6×10^4 CFU) an adhären den Bakterien im Vergleich zum WT-Stamm $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$.

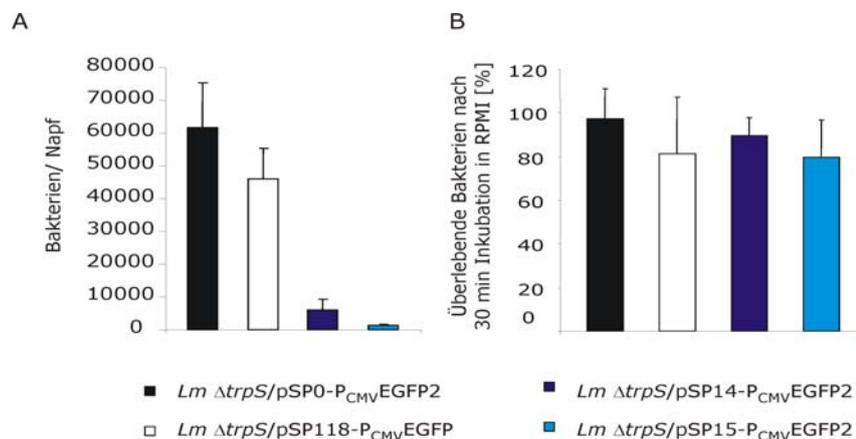


Abb. 5.55: Assay „Lyse bei Zellkontakt“ (A) der *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ in Vergleich zu den Kontrollstämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$ an CACO-2 Zellen und (B) 30 minütiger Inkubation dieser im Kulturmedium RPMI mit nachfolgender Auswertung überlebender nicht-lysierter Bakterien durch Ausplattieren.

Um auszuschließen, dass eine mögliche vorhandene Lyse der Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ im Kulturmedium RPMI die „Lyse bei Zellkontakt“ beeinträchtigt hat, wurden diese zusammen mit den beiden *Lm* Kontrollstämmen in reinem RPMI-Medium für 30 min bei 37% im Zellkulturschrank inkubiert. Die lebende Anzahl der Bakterien wurde im Dreifachansatz vor der Inkubation und nach der Inkubation im RPMI-Medium durch Ausplattieren bestimmt. Ausgewertet wurde in dem die Bakterienanzahl vor der Inkubation mit der Bakterienanzahl nach der Inkubation verglichen wurde. Dabei wurde festgestellt, dass die eingesetzten Stämme nicht im Kulturmedium RPMI lysierten (Abb. 5.55, B).

Um einen ersten Hinweis zu bekommen, was die „Lyse bei Zellkontakt“ der *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ beeinträchtigt hat, wurden diese zusammen mit den Kontrollstämmen *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP$ für Western Blot Analysen vorbereitet. Alle *Listeria* Stämme wurden in BHI-Medium bei 37 °C bis zu einer OD von 1.0 bei 600 nm angezogen und anschließend wurden intrazelluläre und Oberflächenproteine aus dem Zellpellet und exportierte Proteine aus dem Kulturüberstand isoliert. Die Proteinfractionen wurden über SDS-Page ihrer Größe nach aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen,

um schließlich das Ply118 und das Holin118 mit den Kaninchenantisera anti-Hol118 und anti-Ply118 und dem Peroxidase-konjugierten Ziege Anti-Kaninchen IgG Antikörper chemilumineszenziert nachzuweisen.

In den Immunoblots konnten die Proteine Ply118 und Hol118 als Banden der entsprechenden Größen in den Fraktionen der intrazellulären, so wie der Oberflächen-Proteine der *Lm* Stämmen $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ nachgewiesen werden: Holinprotein 10.1 kD, Endolysinprotein: 30.8 kD. Ebenso wurden beide Formen des Holins (Inhibitor und porenformendes Enzym) nachgewiesen (Doppelbande). Außerdem detektierte man, wie theoretisch erwartet, das PLY118 im Stamm $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP$. Die Fraktion der exportierten Proteine zeigten dagegen keine Hol118- und Ply118-Proteine auf. Demnach exprimieren die Stämme wie erwartet, die im Plasmid enthaltenen Phagengene hol118 und ply118. Bemerkenswert ist, dass beide Formen des Holins schon in der Fraktion der Oberflächenproteine der *Lm* Stämmen $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ vorlagen. Der Kontrollstamm $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ konnte wie erwartet keine Expression der Phagengene ermittelt werden, da dieser keine Lysiskassetten enthält (Abb.: 5.56).

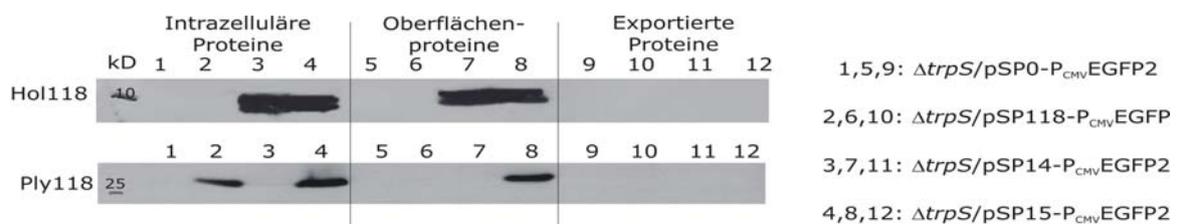


Abb. 5.56: Nachweis der Expression des Phagenlysins 118 und Holins 118 in den *Lm* Stämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP$, $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ im Western Blot. Detektion der Banden unter Verwendung der anti-Holin118 und anti-Phagenlysin118 Seren und dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen IgG.

Da sich die *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ für die Baktofektion aufgrund der wahrscheinlich Zellkontakt-induzierten Lysis als ungeeignet herausgestellt hatten (Abb.: 5.55, A; 5.53 A1, A2), wurden nachfolgend nur noch die beiden *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ näher in ihrem intrazellulärem Verhalten charakterisiert. Anschließend wurden zur weiteren Charakterisierung dieser Bakterien $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ Immunofluoreszenzanalysen mit infizierten Wirtszellen durchgeführt. Es sollte nachgewiesen werden, ob diese Stämme zur intrazellulären und interzellulären Motilität fähig sind. In vorausgegangenen Arbeiten wurde festgestellt, dass für eine effiziente EGFP-Übertragung die bakteriellen Träger motile Fähigkeiten besitzen sollten [235]. Zum Nachweis der Motilität wurden CACO-2 Zellen mit diesen Stämmen und den Kontrollstämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP$ in einer niedrigen MOI von 5 infiziert. Nach Fixierung des Zellrasens 24 und 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit einem anti-ActA Kaninchenserum, gefolgt von einer zweiten Inkubation mit einem FITC-gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen IgG Konjugat gefärbt.

Unter dem Mikroskop konnte beobachtet werden, dass die Stämme $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ sich genauso wie die Kontrollstämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und

$\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$ stark im CACO-2-Zellrasen verteilt hatten (Abb.: 5.56). Eine Vergrößerung der Infektionsherde konnte schon 24 h später dokumentiert werden. Dies bedeutet, dass die neuen autolysierenden *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ zur intrazellulären wie auch zur interzellulären Motilität fähig sind. Außerdem wurde ermittelt, dass die neuen autolysierenden Stämme nach ActA-Anfärbung die erwartete polare Verteilung des ActA-Proteins an den Zellpolen des Bakteriums aufwiesen, im Vergleich zum Kontrollstamm $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$, der eher eine unregelmäßiges Verteilungsmuster des ActA-Proteins aufwies.

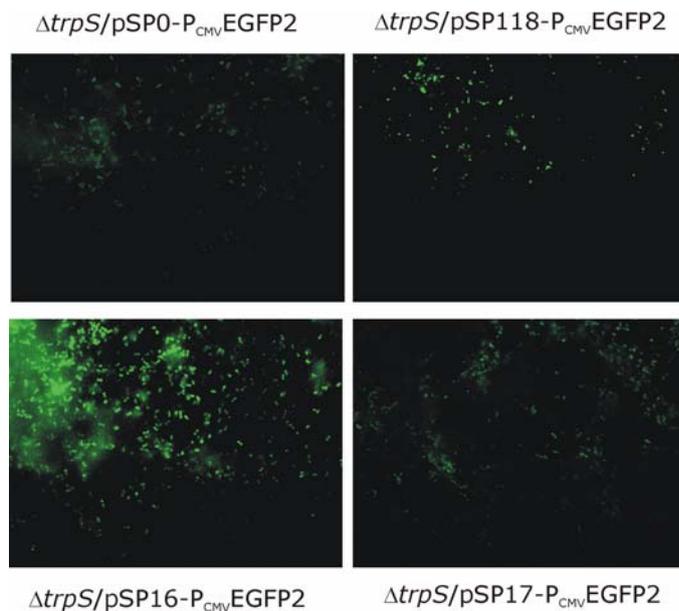


Abb. 5.56: Nachweis der polaren Verteilung des ActA-Proteins auf den neuen autolysierenden *Lm* Stämmen $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ im Vergleich zu den Kontrollstämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$ in infizierten CACO-2 Zellen. Markierung der intrazellulären Bakterien mit dem anti-ActA Kaninchenserum und dem sekundären gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper.

Parallel zu den ActA-Anfärbungen wurden auch Anfärbungen der infizierten CACO-2 Zellen mit dem TRITC-Phalloidin Antikörper zur Darstellung des zellulären Aktins durchgeführt. Indirekt kann durch diese Färbung das Rekrutieren des zellulären Aktins durch die Listerien nachgewiesen werden. Wie in nachfolgender Abb. 5.57 zu sehen ist, konnten die neuen autolysierenden *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ zelluläres Aktin rekrutieren und aufgrund dessen einen Aktischweif ausbilden. Dies befähigte die neuen autolysierenden Stämme zur intrazellulären Ausbreitung in Nachbarzellen.

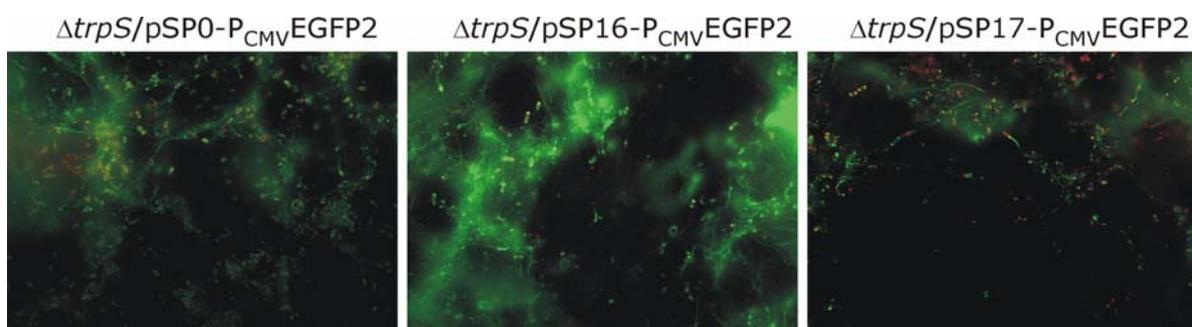


Abb. 5.58: Nachweis der Rekrutierung des zellulären Aktins und Aktischweifbildung der Listerien $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ durch Anti-ActA und Phalloidin-Färbung.

5.4.2.2 Untersuchungen zum Gentransfer in verschiedene Zelllinien mit den alternativen autolysierenden *Lm* Stämmen

Die neuen autolysierenden Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ wurden neben den zwei schon charakterisierten Stämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP1118-P_{CMV}EGFP2$ in verschiedenen Infektionsansätzen zur Ermittlung der jeweiligen Gentransfer-Effizienz und des jeweiligen zytotoxischen Effekts eingesetzt. Gentransfer-Effizienzen der *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ in COS-1 Zellen und P388.D1 Makrophagen sind nachfolgend abgebildet.

Zuerst wurden COS-1 Zellen und P388.D1 Makrophagen parallel mit diesen sechs Stämmen in einer MOI von 5 infiziert. Um einen ersten Eindruck der Gentransfer-Effizienz zu erhalten, wurden die infizierten COS-1 Zellansätze nach 48 h nur im Fluoreszenzmikroskop dokumentiert und die infizierten P388.D1 Makrophagen-Ansätze erst nach 72 h *p. I.* im Durchflußzytometer ausgewertet.

In der Abb. 5.59 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EGFP-exprimierenden COS-1 Zellen nach Infektion mit den sechs Stämmen zu sehen.

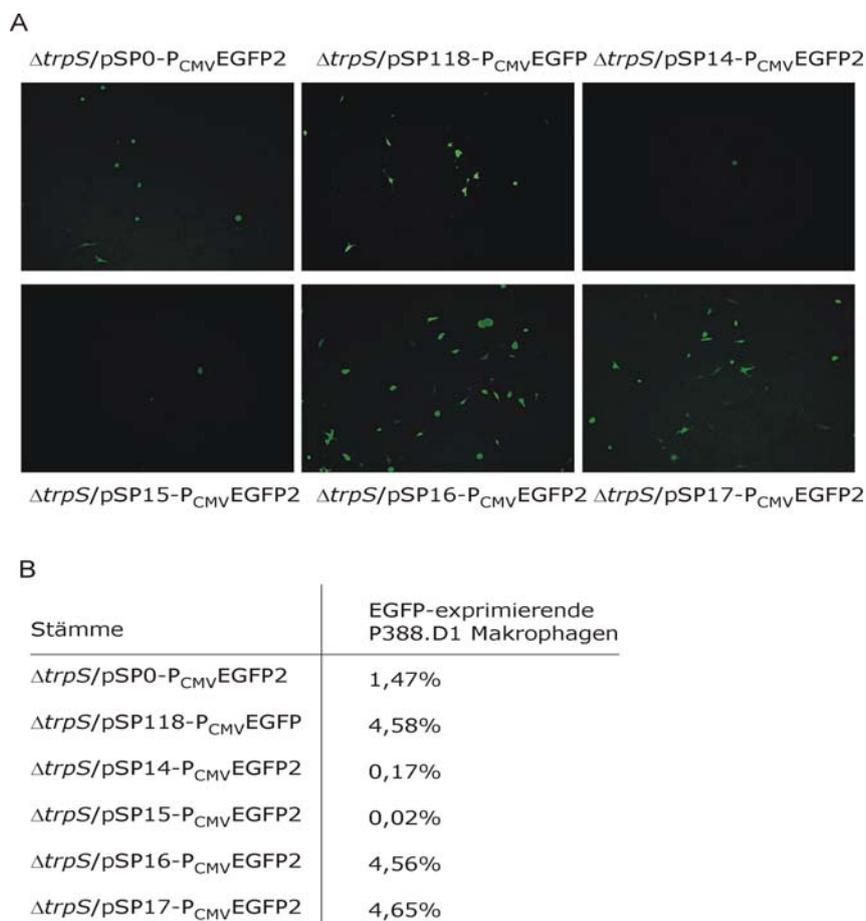


Abb. 5.59: Gentransfer mit den neuen autolysierenden Stämmen $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ im Vergleich zu den zwei schon charakterisierten Stämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP1118-P_{CMV}EGFP2$. (A) Bestimmung der Gentransfer-Effizienz durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von infizierten COS-1 Zellen nach 48 *p. I.* (B) Vergleichende Durchflußzytometrische-Analyse der Gentransfer-Effizienz in P388.D1 Makrophagen.

Die beiden Stämme $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$, die das Holin bzw. das HolinPhagenlysin unter dem *hpt*-Promotor exprimieren, zeigten vergleichbare Gentransfer-Effizienzen wie der Stamm $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$, der das Phagenlysin unter dem *actA*-Promotor exprimiert. Der Stamm ohne Autolysiskassette $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ baktofizierte im Vergleich dazu in geringerer Effizienz, da auch deutlich weniger EGFP-exprimierende Wirtszellen dokumentiert wurden. Auch die beiden Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ bei denen die Holin- und die HolinPhagenlysin-Kassette unter der Kontrolle des *actA*-Promotors steht, liegen in der Effizienz-bedingt durch die Zellkontakt-induzierte Lysis- noch sehr viel niedriger als der wildtypische Stamm $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$. Die gleichen Ergebnisse wurden mit den infizierten P388.D1 Makrophagen quantitativ in der durchflußzytometrischen Analyse erzielt.

Anschließend wurden weitere nicht-phagozytische Zelllinien nur noch mit den beiden Stämmen $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ im Vergleich zu den Kontrollstämmen $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$ infiziert. Die beiden anderen Stämme $\Delta trpS/pSP14-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP15-P_{CMV}EGFP2$ hatten sich aufgrund der Zellkontakt-induzierten Lyse und die damit verbundene schlechte Baktofektionsrate für weitere Studien als ungeeignet herausgestellt.

Die epithelialen Zelllinien, CACO-2, HELA und HEPG2 und die Fibroblasten-Zelllinie COS-1 wurden in einer MOI von 5 mit den vier Stämmen im Triplet infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) nach Infektion wurde die Gentransfer-Effizienz durchflußzytometrisch durch die Anzahl an EGFP-exprimierenden Zellen bestimmt. Parallel dazu wurden MTT-Tests zur Bestimmung des zytotoxischen Effekts auf die Wirtszellen durchgeführt.

Die höchste Anzahl an EGFP-exprimierenden Zellen in allen Zelllinien wurde am Tag 3 nach Infektion ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass auch mit den beiden neuen Stämmen $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ genauso wie schon mit dem alten Stamm $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$ [235] in den verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Gentransfer-Effizienzen beobachtet wurden (Abb. 5.60, A).

Ebenso wurde nachgewiesen, dass in denjenigen Zellen, welche gut mit den Stämmen $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP2$ baktofiziert werden konnten, auch weniger von diesen Listerien abgetötet wurden (Abb. 5.60, B). Demnach geht eine gute Baktofektion immer mit nicht-abgetöteten, lebenden Wirtszellen einher. Daraus folgt aber auch, dass die Lyiskassetten in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich wirken. Das Phagenlysin wirkt allein sehr gut in CACO-2 und HEPG-2 Zellen, wohingegen das Holin oder die Kombination aus HolinPhagenlysin eher in COS-1 oder HELA Zellen zum Einsatz kommt. Außerdem fiel auf, dass das Holin bzw. die Kombination aus HolinPhagenlysin schon früher ihre lysogene Wirkung erzielen, was sich in einer früheren EGFP-Expression der Wirtszellen und damit auch frühere grün-leuchtende Zellen ermittelt werden konnten, zeigte.

Abschließend kann gesagt werden, dass die neuen Stämme mit den Lyiskassetten $P_{hpt}-hol/118$ und $P_{hpt}-holply118$ in manchen Zelllinien wie COS-1 oder HELA-2 wie der alte Stamm mit der Lyiskassette $P_{actA}-ply118$ zur Baktofektion *in vitro* geeignet sind.

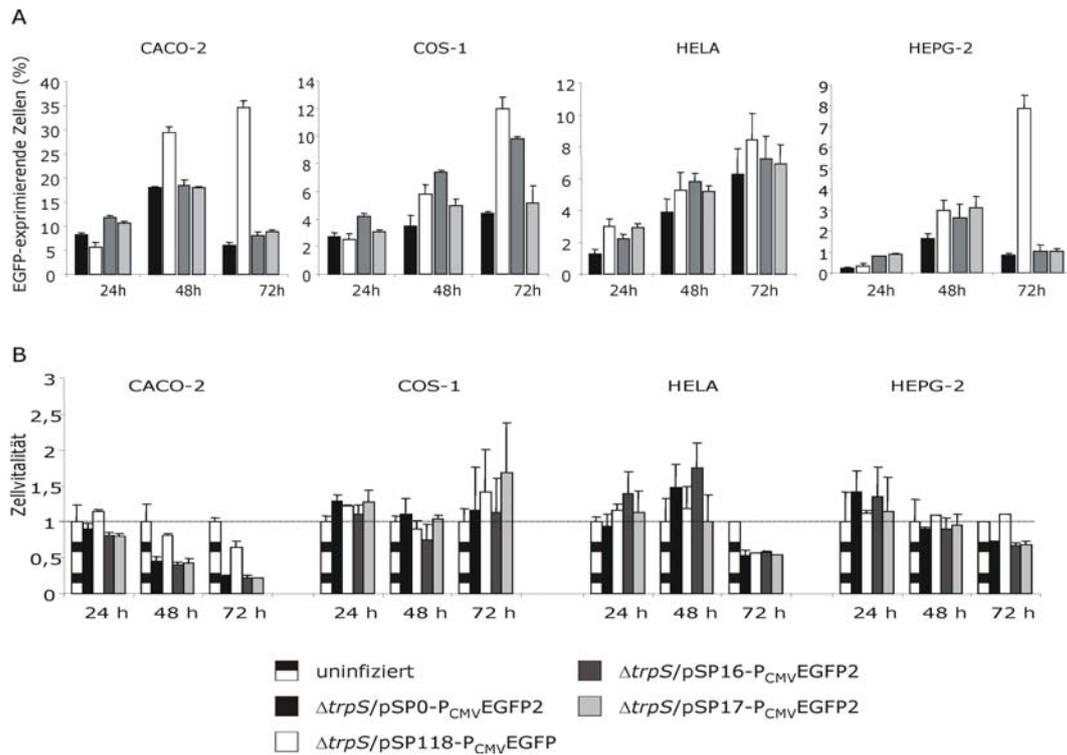


Abb. 5.60: Untersuchungen zur Effizienz der Baktinfektion (A) und zum zytotoxischen Effekt (B) der neuen autolysierenden *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP16-PCMVEGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-PCMVEGFP2$ im Vergleich zu den Kontrollstämmen $\Delta trpS/pSP0-PCMVEGFP2$ und $\Delta trpS/pSP118-PCMVEGFP2$ in verschiedenen Zelllinien. Alle Zelllinien wurden mit einer MOI von 5 mit den Stämmen infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) wurde die Infektionen gestoppt, um die infizierten Zellen am Durchflußzytometer oder mittels MTT-Tests auszuwerten.

5.4.2.3 Intravenöse Infektion von C57BL/6 Mäusen mit den autolysierenden Gentransferstämmen $\Delta trpS/pSP16-PCMVEGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-PCMVEGFP2$

Der Zweck optimaler autolysierender Stämme ist nicht nur die Übertragung des DNA-Vakzins in Wirtszellen, sondern als optimale autolysierende Trägerbakterien sollten sie sich innerhalb der Wirtszelle nicht mehr vermehren, sie sollte vielmehr virulenzattenuiert sein. Deshalb wurde ein *in vivo* Versuch durchgeführt, in dem die CFU der autolysierenden Gentransferstämmen $\Delta trpS/pSP16-PCMVEGFP2$ und $\Delta trpS/pSP17-PCMVEGFP2$ in Leber und Milz von infizierten Mäusen im Vergleich mit dem bisher angewandten autolysierenden Stamm $\Delta trpS/pSP118-PCMVEGFP2$ und dem nicht-autolysierenden WT bestimmt wurde. Dafür wurden 4 Mausgruppen zu je 5 Tieren mit 5×10^3 CFU der jeweiligen Stämme *i.v.* infiziert. Drei Tage nach Infektion wurden die Tiere getötet und die Organe Leber und Milz steril entnommen, um sie anschließend zu homogenisieren und einer 10 sec. Ultraschallbehandlungen zu unterziehen. Die Bakterienzahlen wurden durch Ausplattieren der Organhomogenisate in geeigneten Verdünnungsstufen ermittelt.

Die alternativen autolysierenden Stämme zeigten keinen Unterschied in ihrer CFU in Leber und Milz im Vergleich zum nicht-autolysierenden Stamm $\Delta trpS/pSP0-PCMVEGFP2$ (Abb.: 5.61).

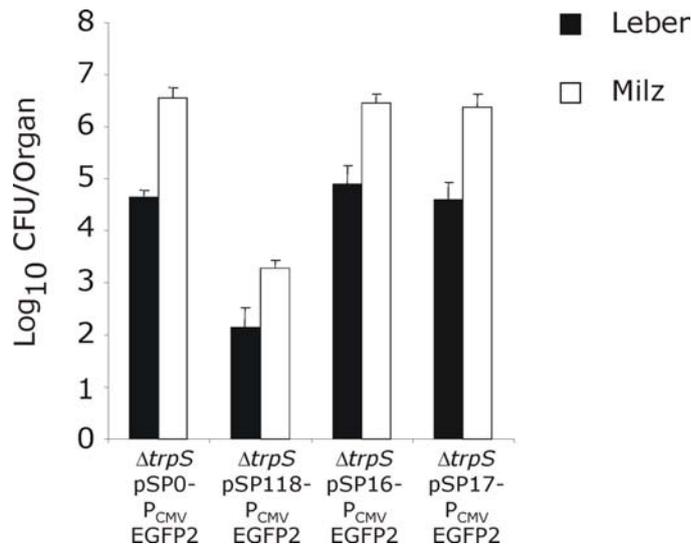


Abb. 5.61: CFU-Bestimmung in den Organen Leber und Milz nach Infektion von BL6 Mäusen mit den autolysierenden Stämmen $trpS/pSP16-P_{CMV}EGFP2$, $\Delta trpS/pSP17-P_{CMV}EGFP$, $trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP$ und dem nicht-autolysierenden WT Kontrollstamm $\Delta trpS/pSP0-P_{CMV}EGFP$. Vier Mausgruppen zu je 5 Tieren wurden mit den jeweiligen Stämmen in einer CFU von 5×10^3 infiziert. Drei Tage nach i.v. Infektion erfolgte die CFU-Bestimmung in den Organen Leber und Milz durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Der Stamm $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP$ zeigte dagegen eine 3 log verringerte Anzahl in Leber und eine 4 log verringerte Anzahl an Bakterien in der Milz. Demnach erfolgte eine Autolysis der Bakterien zu diesem Zeitpunkt *in vivo* nur in Anwesenheit der Expressionskassette $P_{actA-ply118}$ und nicht durch die neuen Lysiskassetten $P_{hpt-hol118}$ oder $P_{hpt-holply118}$ und damit sind die neuen autolysierenden Stämme im Gegensatz zum alten Stamm $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}EGFP$ nicht virulenzattenuiert.

Diskussion

Virulenzattenuierte Stämme des humanen Pathogens *Listeria monocytogenes* stellen aufgrund ihrer intrazellulären Lebensweise optimale Kandidaten als Träger für heterologe Proteinantigene in Wirtszellen dar. Dieses Gram-positive Bakterium repliziert nach Befreiung aus dem primären phagosomalen Kompartiment sehr effizient und schnell im Zytosol sehr vieler nicht-phagozytischer Wirtszellen, wie auch in relevanten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (DC und M ϕ) [302]. Innerhalb der hauptsächlich besiedelten Organe Leber und Milz bewegt sich *Listeria* intrazellulär und interzellulär fort, so dass das extrazelluläre Milieu kaum infiltriert wird. Diese intrazelluläre Lebensweise und die damit verbundene Prozessierung listerieller Antigene im Phagosom und Zytosol der Wirtszellen führt hauptsächlich zur Aktivierung einer zellvermittelten Immunität unter Beteiligung CTLs und T_H1-Helferzellen [224]. Damit stellt *Listeria* eine viel versprechende Plattform für Impfstoffe gegen Erreger von Infektionskrankheiten oder z.B. gegen Tumore dar, welche starke CD8 und CD4 T-Zell-Antworten benötigen [165]. Auch die Tatsache, dass schon viele geeignete virulenzattenuierte Stämme entwickelt wurden, erleichtert es, *Lm* als potentiellen Vektor für den Transport von heterologen Proteinantigenen einzusetzen, ohne dass der Wirt ernsthaft erkranken würde [6, 289]. Des Weiteren hat man die Möglichkeit, durch die intrazellulär replizierende *Listeriae*, heterologe Antigene in Form von selbst-exprimierten Fremdproteinen, Plasmid-DNA oder als eine neue Strategie, als mRNA, in das Zytosol der Wirtszelle übertragen zu lassen. Die Fähigkeit, als Vektor für verschiedene biologisch relevante Moleküle, wie z. B. Tumorantigene, virale, bakterielle oder parasitäre Antigene in Form von selbst-exprimierten Proteinen oder Plasmid-DNA zu fungieren, wurde schon in unterschiedlichen Tiermodellen untersucht [136, 170, 206, 273, 286, 280].

All diese bisher aufgeführten Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass virulenzattenuierte Stämme des Bakteriums *Listeria monocytogenes* als Impfstoffträger geeignet sind. Deshalb hatte die vorliegende Arbeit das Ziel, die Effizienz einer in dieser Arbeitsgruppe etablierten, virulenzattenuierten „chromosome-plasmid balanced lethal system“-Mutante *Lm* $\Delta trpS/pflotrps$ als Impfstoffträger für heterologe Proteinantigene am Beispiel des Hühnereiweißes Ovalbumin in die Maus näher zu charakterisieren.

Plasmidkodiertes Ovalbumin wurde in Form von bakteriell exprimierten und exportierten Protein, in Form von DNA oder von mRNA durch Listerien in das Zytosol der Wirtszelle freigesetzt. Die Freisetzung wurde durch ein *Listeria*-spezifisches Phagenlysin, welches von den Bakterien vorwiegend im Zytosol der Wirtszelle exprimiert wird, ermöglicht. Die Übertragung dieser drei unterschiedlich biologisch aktiven Moleküle führte im Falle des Proteins und der mRNA erfolgreich zu einer MHC-Klasse-I-Präsentation eines Ovalbumin-Peptides (SIINFEKL), welche letztendlich eine adaptive zelluläre Immunität unter Beteiligung von T-Gedächtniszellen induzierte. Dabei stellte sich die Übertragung des Proteins durch *Lm* („Protein-Delivery“) als die effizienteste Strategie in der

Induktion einer CD8 und einer CD4 T-Zell-Immunantwort, gerichtet gegen das heterologe Antigen Ovalbumin, heraus. Zusätzlich wurde neben der Effizienz der *Lm* $\Delta trpS$ Mutante als Überträger von Ovalbumin auch die jeweilige Effizienz der *Lm* Mutanten $\Delta trpS$ *hlyW491A* und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ bestimmt.

Anschließend wurde in diesem Zusammenhang festgestellt, auf welcher Art und Weise das Proteinantigen von den Bakterien am besten exprimiert wird (exportiert, zellwandverankert oder intrazellulär in den Bakterien verbleibend) und in welches Kompartiment der Wirtszelle dieses Antigen übertragen werden sollte, damit eine effiziente MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-restringierte Antigenpräsentation *in vivo* induziert werden kann.

Weiterhin wurden zusätzlich bekannte Virulenzgene wie *actA*, *inlA* und *inlB* von *Lm* in den Ausgangsstamm *Lm* $\Delta trpS$ deletiert. Diese neuen virulenzattenuierten Mutanten wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Impfstoffträger für spätere *in vivo* Anwendungen charakterisiert.

Abschließend wurden autolysierende Listerien konstruiert, die alternative plasmidkodierende Lysiskassetten tragen, welche eine intrazelluläre Lysis des Bakteriums und die damit einhergehende Freisetzung von Expressionsplasmiden in das Zytosol von Wirtszellen gewährleisten sollten.

6.1 Die Effizienz der Übertragung von DNA, mRNA oder Proteinen durch die jeweiligen virulenzattenuierten *Lm* $\Delta trpS$ Stämme in die Maus

In dieser Arbeit wurden zuerst verschiedene Expressionsplasmide für Ovalbumin konstruiert, die von *Listeria* in das Zytosol von Wirtszellen übertragen werden. Diese Expressionsplasmide erlauben die Expression und den Export des Antigens durch die Verwendung des Promotors und der Signalsequenz des Gens *actA* (pSP118-PS_{*actA*}OVA), die Expression des Antigens durch den Wirt mit Hilfe des starken CMV-Promotors (pSP118-PCMV OVA) und die T7-Polymerase-vermittelte Transkription der antigenkodierenden mRNA durch das Trägerbakterium mit anschließender Translation durch den Wirt (pCSA1+pCSB-OVA).

Die Expressionsplasmide pSP118-PS_{*actA*}OVA, pSP118-PCMV OVA und pCSA1 replizierten vollkommen stabil in *Lm* $\Delta trpS$ ohne Antibiotikazusatz, verursacht durch die Einführung einer Expressionskassette auf die Plasmide, welches für eine essentielle Tryptophanyl-tRNA-Synthetase (TrpRS) von *Lm* kodiert [233, 235]. Dabei resultierte die Freisetzung der Plasmid-DNA oder der mRNA durch Autolysis der Trägerbakterien im Zytosol der Wirtszelle. Diese Autolysis wurde durch ein *Listeria*-spezifisches Phagenlysin vermittelt, welches unter der Kontrolle des *actA*-Promotors plasmidkodierend vorliegt [67]. Mit allen drei Strategien wurde schon erfolgreich die Übertragung von Antigenen oder antigenkodierenden Nukleinsäuren in antigenpräsentierenden Zellen *in vitro* nachgewiesen [67, 235, 266]. Welche Strategie dabei die beste ist, um eine möglichst starke CD8 und CD4 T-Zell-Antwort gegen heterologe Antigene in Form von Proteinen oder antigenkodierenden Nukleinsäuren *in vivo* zu induzieren, wurde in dieser Arbeit herausgefunden.

Für die Konstruktion der jeweiligen OVA-Expressionskassetten wurde die Ovalbuminsequenz verkürzt, in dem sie ohne die natürliche interne Signalsequenz kloniert wurde, so dass letztendlich das exprimierte OVA aus den AS 145-386 bestand. Dadurch sollte dieses verkürzte Konstrukt nicht ins extrazelluläre Milieu exportiert werden und erhält so wahrscheinlich einen besseren Zugang

zum proteasomalen Abbau und der MHC-Klasse-I-Präsentationsmaschinerie und zu „cross presentation“ und „cross priming“ Ereignissen, wie es auch schon in anderen Publikationen beschrieben wurde [185, 259, 276]. Zusätzlich wurde die Fragestellung welche „Delivery“-Strategie am Besten geeignet ist, um eine Aktivierung von OVA-spezifischen T-Lymphozyten zu induzieren, mit dem adoptiven Transfer von OVA-spezifischen CD8 und CD4 T-Lymphozyten aus transgenen Mäusen (OT-I und OT-II-Mäuse) beantwortet. Dabei ist der adoptive Transfer eine sehr sensitive und quantitative Methode zur Analyse von „Priming“-Ereignissen [227, 259]. In den adoptiven Transferexperimenten stellte sich das „Protein-Delivery“ mit autolysierenden *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$ als die effizienteste Strategie heraus, um beide CD8 oder CD4 T-Lymphozyten zu „primen“. Auch autolysierende *Lm* Stämme ($\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$), welche mit den Expressionsplasmiden für das „RNA-Delivery“ transformiert wurden, konnten eine erfolgreiche Aktivierung und Proliferation von CD8 T-Lymphozyten *in vivo* induzieren, jedoch wurden in Mäusen, welche mit den respektiven *Lm* Stämmen infiziert worden sind, weniger proliferierende Zellen gemessen als in denjenigen Mäusen, welche mit Protein-übertragenden Stämmen infiziert worden waren. Eine Aktivierung von CD4 T-Lymphozyten durch die Listerien, welche die RNA übertrugen, wurde dagegen nicht nachgewiesen. Dies lässt Rückschlüsse zu, dass das zytosolisch-exprimiertes Ovalbumin durch die Wirtszellen, welches aus dem „RNA-Delivery“ stammt, keinen Zugang zu der MHC-Klasse-II-Präsentationsmaschinerie hatte. Weiterhin folgt daraus, dass kein extrazelluläres Ovalbumin vorlag und demnach auch keine „cross-presentation“. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das gewählte System des adoptiven Transfers zum Nachweis einer MHC-Klasse-II-Präsentation nicht empfindlich genug war, denn eine Aktivierung von OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen benötigt 10-mal mehr OVA Protein (zellassoziert oder extrazellulär) als die Aktivierung von OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen [185]. Im Vergleich zu den beiden anderen Trägerstämmen zeigten autolysierende *Lm* Stämme $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}OVA$, welche die Ovalbumin-kodierende Plasmid-DNA übertrugen („DNA-Delivery“), keinen Erfolg beim „Primen“ von CD8 oder CD4 T-Lymphozyten.

Analoge Ergebnisse wurden auch hinsichtlich einer CD8 und CD4 T-Gedächtniszellantwort, gerichtet gegen OVA, nach dreimaliger *i.v.* Applikation der drei *Lm* Trägerstämmen erzielt. Dieses Immunisierungsexperiment stellt eine Methode zur Bestimmung der natürlichen adaptiven Immunreaktion gegen das Antigen dar [141]. Wiederum zeigte sich der Stamm, welcher das Protein übertrug als sehr effizient im Induzieren einer adaptiven CD8 und CD4 T-Gedächtniszellantwort. Listerien, die die Ovalbumin-kodierende RNA freisetzten, ermöglichten ebenso die Induktion einer adaptiven Immunantwort mit CD8 T-Gedächtniszellen. Jedoch wurden deutlich niedrigere Zahlen an IFN- γ -sezernierenden CD8 T-Zellen nachgewiesen, als diejenigen, welche durch die Übertragung des Proteins induziert wurden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass dieser „RNA-Delivery“-Stamm keine signifikanten Anzahlen an CD4⁺ T-Helferzellen induzierte, die zur Expansion von CD8⁺ T-Gedächtniszellen benötigt werden [142, 271, 291]. Demnach scheint extrazelluläres Ovalbumin nur bei Anwesenheit des Stammes, welcher das Ovalbumin als Protein exportiert vorhanden zu sein. Dieses OVA, welches von den Bakterien unter der Kontrolle des *actA*-Promotors exprimiert und anschließend mittels *actA*-Signalsequenz exportiert wurde, könnte Zugang zum MHC-Klasse-II-Präsentationsweg durch den *actA*-Promotor bekommen haben, der extrazellulär minimal aktiv ist [34, 35]. Dies unterstreicht zusätzlich die Eignung des „Protein-Delivery“ als Impfstoffstrategie, da auch T-Helferzellen effizient aktiviert wurden. Sobald

Helferzellen aktiviert sind, verstärken sie CTLs in ihrer Effektorfunktion [142, 271]. Die Effektorfunktion wird z. B. dadurch verstärkt, dass die CD4 T-Zelle kostimulierende Signale an ihre APCs sendet, die wiederum nun vermehrt CD40 exprimiert, wodurch die gebundene CD8 T-Zelle an dieser APC zur verstärkten IL-2 Produktion kostimuliert wird. Die IL-2 Produktion fördert die Proliferation und Differenzierung der CD8 T-Zelle [141]. Diese Verstärkung der CTLs durch die CD4 T-Helferzellen könnte auch beim Abtöten infizierter Leberzellen während des adoptiven Transferexperimentes geholfen haben, da jedes Mal signifikant weniger Bakterien nur in Lebern solcher Mäuse gefunden wurden, welche mit den Protein-übertragenden Listerien infiziert waren. Listerien, welche die Ovalbumin-kodierende DNA freisetzen, ermöglichten keine Induktion einer CD8 und CD4 T-Gedächtniszellantwort. Die Immunisierung von C57BL6/Mäusen mit OVA-Protein-, mit OVA-DNA- oder OVA-mRNA-transferierenden Listerien erzeugte dagegen keine humorale Immunantwort mit IgG-Antikörpern gerichtet gegen dieses Antigen.

6.2 Die Charakterisierung der unterschiedlichen Erfolge der drei Vakzinierungsstrategien

Die unterschiedlichen Erfolge der drei Vakzinierungsstrategien hinsichtlich der Aktivierung von T-Lymphozyten sind nicht einfach zu beantworten, sondern eher von komplexer Natur. Wie festgestellt und beschrieben wurde, konnte jede Strategie unter der Verwendung des Modellantigens OVAs (oder auch des IE1 aus dem CMV) für sich *in vitro* charakterisiert und dementsprechend funktionell nachgewiesen werden. So konnte die Expression des exportierten OVAs in BHI-Kulturüberständen des Protein-übertragenden Stammes $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$ in Western Blot Analysen eindeutig nachgewiesen werden, wohingegen die anderen Stämme, die OVA-kodierende DNA ($\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}OVA$) oder RNA ($\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$) übertragen keine Expression zeigten. Auch die Expression des OVAs durch CACO-2 Zellen nach Transfektion mit den reinen Plasmiden für alle „Delivery“-Strategien, wurde nur in den Zellen nachgewiesen, welche mit dem Plasmid $pSP118-P_{CMV}OVA$ des „DNA-Deliverys“ transfiziert worden waren. Ebenso wurde die Freisetzung der Plasmid-DNA durch den *Lm* Trägerstamm $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}OVA$ mit anschließender Expression des OVAs durch Wirtszellen in Immunofluoreszenzanalysen bestätigt. Auch konnte transkribierte OVA-mRNA nach Isolierung von Gesamt-RNA aus den mit BHI kultivierten Stämmen, welche das Protein oder die OVA-kodierende RNA übertragen mittels Slot-Blot Analyse nachgewiesen werden. Nur diesen Stämmen war es möglich, OVA-mRNA zu transkribieren. Jedoch stellte sich der *in vitro* Nachweis der Expression des OVAs nach Infektion von CACO-2 Zellen mit den drei OVA-übertragenden Stämmen $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$, $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}OVA$ und $\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$ als schwierig heraus. Nur das OVA, welches durch die Stämme $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}OVA$ und $\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$ freigesetzt wurde, wurde in den infizierten Zellextrakten nachgewiesen. Ovalbumin, welches durch den Stamm übertragen wurde, der das OVA-Protein exportiert, konnte dagegen nicht in den Zellextrakten nachgewiesen werden. Dabei stellte sich heraus, dass die Expression der OVA-mRNA schon nach 24 Stunden nachgewiesen werden konnte, wohingegen die Expression der OVA-DNA erst nach 48, stärker nach 72 Stunden *p. i.* nachgewiesen wurde. Jedoch wurde mit dem *Lm* Stamm $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$, der das OVA-Protein überträgt, die stärkste Aktivierung von OT-I Zellen induziert, was eindeutig für ein Vorhandensein des OVA-Proteins im Zytosol infizierter Zellen mit anschließender Prozessierung

in geeignete Peptide spricht. Im Gegensatz dazu erreichten die Stämme des „RNA-“ und „DNA-Deliverys“ eine schwächere Aktivierung von OT-I Zellen, obwohl *in vitro* eine deutliche Expression des OVAs in infizierten Zellen nachgewiesen wurde. Auch die Anzahl der intrazellulären Bakterien der drei „Delivery“-Strategien innerhalb einer Infektion mit murinen J774 Makrophagen waren sehr unterschiedlich. Es wurden genauso viele Bakterien, die die OVA-kodierende DNA übertragen, wie wildtypische Bakterien in den infizierten Zellen gefunden. Ebenso replizierte dieser Stamm intrazellulär genauso gut wie der WT Stamm. Die beiden anderen Stämme, welche das OVA-Protein oder die OVA-RNA übertragen, wurden dagegen in niedrigeren Anzahlen in den Infektionsansätzen nachgewiesen. Des Weiteren verringerte sich die Anzahl der intrazellulären Bakterien des Stammes $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$ im Infektionsverlauf, wohingegen eine Vermehrung der Bakterien der Stämme $\Delta trpS/pSP118-P_{CMV}OVA$ und $\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OVA$ nachgewiesen wurde. Die beiden Stämme für die Strategien des „RNA-“ und „DNA-Deliverys“ konnten sich intra- und interzellulär ausbreiten, wohingegen der Stamm, der das OVA-Protein exportiert, dies nicht tat.

Tabelle 6.1: Charakteristika der *Lm* Stämme für die jeweiligen Vakzinierungsstrategien

| | „RNA-Delivery“ <i>Lm</i> $\Delta trpS/$ pCSA1+pCSB-OVA | „DNA-Delivery“ <i>Lm</i> $\Delta trpS/$ pSP118- $P_{CMV}OVA$ | „Protein-Delivery“ <i>Lm</i> $\Delta trpS/$ pSP118- $PS_{actA}OVA$ |
|--|--|--|--|
| Fähigkeit zur Invasion | + | +++ | ++ |
| Replikation | ++ | ++ | +/- |
| Mobilität | + | + | - |
| Nachweis des OVAs in infizierten Zellen | + | + | - |
| Attenuation des Stammes | ++ | + | ++ |
| Nachweis von aktivierten und proliferierten CD8 ⁺ OT-I Zellen | + | - | +++ |
| Nachweis von proliferierten CD4 ⁺ OT-II Zellen | - | - | +++ |
| Nachweis von CD8 T-Gedächtniszellen | + | - | +++ |
| Nachweis von CD4 T-Gedächtniszellen | - | - | +++ |

Jedoch weist die verminderte Wachstumsrate und auch die erniedrigte Invasionsrate in CACO-2 Zellen und Makrophagen der Stämme, welche die RNA oder das Protein übertragen auf eine metabolische Belastung der Bakterienzelle hin. Die metabolische Belastung der Bakterienzelle, die die RNA übertragen soll, wird durch die Synthese großer Mengen an nicht-translatierter mRNA

durch das plasmidbasierte T7-Expressionssystem verursacht. Im Falle der Bakterienzelle, die das Protein überträgt, stellt die vermehrte Synthese des heterologen Proteins eine erhebliche metabolische Belastung dar, die zusätzlich durch den Export zahlreicher Proteine noch verstärkt wird. Die vermehrte Synthese des Proteins und des plasmidkodierten T7-Expressionssystems erklärt sich durch die PrfA-vermittelte Aktivierung des *actA*-Promotors [28] unter dessen Kontrolle beide Expressionskassetten kloniert sind. Des Weiteren kann der übermäßige Export des Proteins über die Zellwand auch zu einer Veränderung des geordneten Aufbaus der bakteriellen Zellwand führen. Andere Gruppen zeigten ebenfalls auf, dass allein die starke Expression eines heterologen Antigens zu einer nicht unerheblichen metabolischen Belastung führt und dadurch zu einer herabgesetzten Virulenz (zusammengefasst in [88]). Diese reduzierte Fitness spiegelt sich auch in einer deutlichen Attenuation der Stämme $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$ und $\Delta trpS/pCSA1+pCSB-OV$ nach *i. v.*-Infektion von C57BL/6-Mäusen wider.

Diese *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse führen unweigerlich zur Annahme, dass die Zeit der Freisetzung, der Expression und der Prozessierung nach Infektion und der gleichzeitige Beginn der Abwehrmechanismen gegen Listerien die ausschlaggebenden Faktoren für die unterschiedlich effizienten Aktivierungen von CD8 und CD4 T-Zellen sind. Das heterologe Protein, welches aus den Trägerbakterien freigesetzt wird hat demnach einen klaren Vorteil den anderen Proteinen gegenüber, welche erst exprimiert oder translatiert werden müssen. Die Vorteile der sogenannten „Protein-Delivery“-Strategie werden nachfolgend diskutiert.

6.2.1 Die Übertragung des Proteins

Bakterien, wie z. B. Listerien, Salmonellen, Shigellen und Yersinien, die heterologe Antigene übertragen gelten als starke Immunaktivatoren, da sie sehr früh mit ihren PAMPs angeborene Immunantworten stimulieren, die letztendlich aber auch zu lang anhaltenden adaptiven Immunantworten führen [128, 165, 184]. Die Initiierung einer Immunantwort ist die Erkennung von Fremdanitigenen auf antigenpräsentierenden Zellen [141]. Dabei werden DCs als die wichtigsten professionell antigenpräsentierenden Zellen angesehen, da sie besonders in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren [137, 183]. DCs spielen auch in der frühen Phase der listeriellen Infektion eine sehr große Rolle [241, 296]. Diese frühe Erkennung von präsentierten Fremdanitigenen auf DCs durch T-Zellen und die damit verbundene Aktivierung dieser T-Zellen gegen die Trägerbakterien, führen indirekt auch zu einer frühen Etablierung der Immunreaktion gegen das heterologe „Passagier“-Antigen, welches von den Trägerbakterien übertragen wird. Dies gilt vor allem für ein heterologes Protein, welches von den Trägerbakterien exprimiert und anschließend exportiert wird. Theoretisch sollte das OVA-Protein, das von den Bakterien selbst exprimiert und exportiert wurde, schon sehr früh während des Infektionsverlaufs im Zytosol der Wirtszelle vorhanden sein. Sobald das Bakterium an die Wirtszelle adhärert, wird der globale listerielle Regulator PrfA aktiviert, was anschließend auch zur Aktivierung von PrfA-abhängigen Genen führt, die innerhalb der Zelle weiter angeregt exprimiert werden [246]. Dazu gehört auch *actA*, dass vor allem im Wirtszellzytosol vermehrt exprimiert wird. Ferner wird dem ActA auch eine Rolle bei der Internalin-unabhängigen Aufnahme in Wirtszellen zugesprochen [5, 290]. Daraus folgt, dass der *actA*-Promotor schon bei Zellkontakt aktiviert wird. Da die OVA-Expressionskassette

des „Protein-Deliverys“ unter der Kontrolle des *actA*-Promotors steht, kann man sich vorstellen, das OVA sehr stark von den Bakterien exprimiert wurde, sobald sie von DCs phagozytiert wurden. Demnach stand das listeriell-exprimierte OVA-Protein aus dem „Protein-Delivery“ im Vergleich zur OVA-mRNA („RNA-Delivery“) oder OVA-DNA („DNA-Delivery“) sehr schnell für den proteasomalen Abbau und für die Prozessierung in geeignete Epitope zur Verfügung. Außerdem ist nachgewiesen worden, dass je mehr Protein schon am Anfang einer Infektion vorhanden war, desto höher der Anstieg der MHC-Klasse-I-Präsentation [211, 12]. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass je mehr OVA-exportierende Listerien in die Maus appliziert wurden und deshalb auch mehr OVA-Protein für die Prozessierung in geeignete Epitopen zur Verfügung stand, desto höher die Anzahl an gemessenen proliferierenden CD8⁺ T-Zellen. Die limitierenden Schritte sind dabei die Bindung der Peptide an MHC-Klasse-I-Moleküle, die Prozessierung und der Transport der Peptide oder die Verfügbarkeit und Affinität für die MHC-Klasse-I-Moleküle [211].

Ein weiterer Hinweis für die Eignung des „Protein-Deliverys“ als erfolgreiche Impfstoffstrategie ist die effiziente Sezernierung von Interferon- γ (IFN- γ) durch den Stamm, der das Protein übertrug. Es wurden *in vitro* Versuche mit infizierten Knochenmarks-DCs durchgeführt, welche mit OT-I Zellen 6 h inkubiert wurden. Dadurch konnten diese OT-I Zellen zur Stimulation von IFN- γ angeregt werden. Vor allem Proben, welche mit dem Stamm, der das Protein übertrug infiziert wurden, zeigten eine sehr effiziente IFN- γ -Ausschüttung. IFN- γ ist einer der wichtigsten Schlüsselproteine der angeborenen Immunität gegen *Listeria* [37, 132]. Das Interferon wird sehr schnell von aktivierten NK-Zellen, CTLs wie auch von T_H1-Helferzellen ausgeschüttet [18]. Die vermehrte Anwesenheit des IFN- γ führt zur Bildung von so genannten Immunoproteasomen, die wiederum verstärkt verschiedene Aminopeptidasen induzieren. Normalerweise werden zytosolische Proteine kontinuierlich abgebaut und neu synthetisiert [141]. Eine wichtige Rolle beim zytosolischen Abbau spielt dabei das Proteasom, ein multikatalytischer Proteasekomplex [141, 82]. Der Proteasom-abhängige Proteinabbau ist ein komplexer, fein regulierter Prozess, der bei allen zellulären Prozessen eine Rolle spielt. Durch das Proteasom findet ein gezielter Abbau von spezifischen Substraten statt, die z. B. bei der Regulation des Zellzyklus, Zellteilung, Genexpression, Zelldifferenzierung, Signaltransduktion, Reparatur der DNA, Apoptose und der Modulation von Oberflächenrezeptoren, beteiligt sind [82]. Beim Proteasom-abhängigen Abbau der Proteine in Peptide haben nur 15 % davon die korrekte Länge mit korrekten Carboxyl- (C-)ende für einen effizienten TAP-1/TAP-2 („transporters associated with antigen processing-1 and -2“)-abhängigen Transport ins Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) und ein korrektes Amino- (N-)ende („epitope precursore“) [252, 287]. Die Mehrheit der so generierten Peptide wird durch zytosolische Aminopeptidasen oder Endopeptidasen weiter zu AS abgebaut [82]. Deshalb sind die meisten zu kurz (< 8 AS) oder aber auch zu lang, um ins ER transportiert zu werden [313]. Über 99 % der intrazellulären Peptide werden zerstört, der Rest bindet an TAP-1/TAP-2 [313]. Peptide mit der richtigen Länge gelangen durch den TAP-1/TAP-2-abhängigen Transport ins Lumen des ERs [208]. Innerhalb des ERs werden sie noch mal auf die korrekte Länge (8-12 AS) durch ER-residente Aminopeptidasen gekürzt, um später ins MHC-Klasse-I- β_2m -Heterodimer mittels seines C- und N-Endes eingebaut zu werden. Der Einbau stabilisiert nun den Komplex [313, 82]. Dieses zusammengesetzte MHC-Klasse-I-Molekül mit Peptid verlässt das ER und wird mittels des Golgi-Apparates zur Plasmamembran der Zelle gebracht, wo es nun für CD8 T-Lymphozyten zugänglich ist [57]. Bei IFN- γ -abhängiger Aktivierung von Immunoproteasomen stellen diese nun größere

Mengen an längeren Antigenpeptiden mit dem passenden N-Enden (2- 4-fach erhöht) her [82, 252]. Dadurch wird die MHC-Präsentation über die Klasse-I erhöht und die konstitutive proteolytische Kaskade, vor allem während der frühen Phase einer neuen Infektion, unterstützt. Damit erlaubt dieses System die schnelle Anpassung an benötigte immunologische Abwehrsysteme. Ebenso kann es aber auch sehr schnell abgeschaltet werden, wenn es nicht mehr benötigt wird. Außerdem hat die Forschergruppe um Benham herausgefunden, das durch IFN- γ Stimulierung, auch gerade neue, prozessierte Peptide einen schnelleren Zugang zu MHC-Klasse-I-Moleküle haben [16]. Demnach gewährleistet die Modulierung des Proteasoms durch IFN- γ nicht nur eine schnelle und effiziente Peptidselektierung, sondern auch eine optimale CTL-Antwort gegen neue Antigene. Dadurch wird ein positiver Effekt auf die MHC-Klasse-I-Präsentation vermittelt [287] und indirekt auch auf das „Protein-Delivery“. Bei Infektion mit dem Stamm, der das OVA-Protein ins Zytosol der Wirtszelle exportierte, lag dieses sofort im Zytosol vor. Dadurch wurde dieses Protein schneller abgebaut, als das Protein, welches erst von der Zelle exprimiert („DNA-Delivery“) oder translatiert („RNA-Delivery“) werden musste. Da kein bakteriell-exportiertes OVA in den Zellextrakten, welche mit dem Protein-übertragenden Stamm infiziert waren, auch nicht mittels sensitiver Methoden wie der Immunpräzipitation gefunden wurde, könnte dies ein Hinweis für den schnellen Abbau des OVAs sein.

Ein weiterer Hinweis des schnellen Abbaus von bakteriell-exprimierten OVA-Proteinen sind bekannte Studien mit dem Listeriolysin O aus *Lm* [304]. Auch LLO wird in relativ geringer Menge von den Bakterien exportiert und konnte deshalb nur bei Anwesenheit eines Proteasominhibitors nachgewiesen werden [304]. Gleichzeitig wird es aber sehr effizient den CD8 T-Zellen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert. Da auch der Protein-übertragende Stamm $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}$ OVA nach Infektion in geringer Anzahl intrazellulär zu finden war und deshalb wahrscheinlich auch kleinere Mengen an OVA-Protein exportiert wurde, verwendeten wir auch einen spezifischen Proteasominhibitor, namens Lactacystin [16], um die zytosolische Expression des OVAs nachzuweisen. Jedoch führte der Zusatz des Lactacystins nicht zum Nachweis des Ovalbumins, welches von *Listeria* exprimiert und ins Zytosol exportiert wurde. Demnach wurde wahrscheinlich das bakterielle OVA noch anderes abgebaut. Des weiteren könnte durch diese Beobachtung spekuliert werden, das einige Antigene, trotz ihrer geringen intrazellulären Anwesenheit, wie auch hier am Beispiel von OVA oder auch mit LLO [304] gezeigt werden konnte, den Vorteil haben, schneller abgebaut und in geeignete Peptide prozessiert zu werden, als andere Antigene.

Bakteriell exprimierte Proteine werden im Gegensatz zu eukaryotisch exprimierten Proteinen nicht posttranslational modifiziert. Eine posttranslationale Modifikation schützt eine Zeitlang vor dem Abbau, damit verlängert sich auch die Halbwertszeit. Ovalbumin wird zum Beispiel glykolytiert und zweimal phosphoryliert [133]. Damit ändert sich die Halbwertszeit von Ovalbumin von 10 Stunden (*in vivo* in *E. coli*) zu über 20 Stunden in Säugerzellen [93]. Da das Ovalbumin aus dem Stamm, welcher das Protein exportiert wahrscheinlich nicht nachträglich von der Wirtszelle posttranslational modifiziert wurde, stand dieses Protein für die Prozessierung in geeignete Epitope schneller zur Verfügung.

6.2.2 Die Übertragung der Plasmid-DNA und der RNA

Obwohl zahlreiche Publikationen existieren, die den effizienten und erfolgreichen *in vivo* Einsatzes von *Lm* als Träger heterologer Proteine im Tiermodell [105, 116, 321, 229] beschreiben, sind auch

zwei Berichte zur erfolgreichen *in vivo* Übertragung von Plasmid-DNA durch Listerien veröffentlicht worden [206, 280]. Paterson publizierte vor kurzen autolysierende *Lm*, die eine Onkoprotein (E7)-kodierende Plasmid-DNA in Tumormäuse freisetzen und dadurch eine anti-Tumor-Immunität mit spezifischen CD8 T-Zellen induzieren, welche anschließend den Tumor verkleinerten. Diese Strategie war aber nicht sehr effizient und sogar schlechter als der Transfer des selbst-exprimierten Tumorantigens durch *Lm* [280]. Miki *et al.* dagegen beschrieb die erfolgreiche Induktion einer protektiven zellulären Immunität gerichtet gegen *Mycobacterium tuberculosis* nach Transfer der plasmidkodierte DNA für die mykobakteriellen Antigene Ag85A und Ag85B durch attenuierte autolysierende *Lm* [206]. Die Gründe für den „DNA-Delivery“-Erfolg der beiden Gruppen könnten darin liegen, dass sie andere Antigene (bakterielle Antigene, Tumorantigene versus verkürztes eukaryotisches Antigen), andere virulenzattenuierte Stämme (die Motilitätsdefiziente $\Delta 2$ Mutante, in der das gesamte Lecithinaseoperon fehlt oder *dal/dat* Mutante versus der *trpS aroA/B* Mutante), andere experimentelle Setups (Protektion nach *i. v.* Challenge mit *Mycobacterium tuberculosis* oder Messung der Tumorverkleinerung versus Repertoire an IFN- γ sezernierenden T-Zellen nach *i. v.* Immunisierung) verwendet hatten.

Die Hauptgründe der schlechten Baktofektion der APCs durch *Listeria* sind die Ineffizienz und die Langsamkeit dieser Strategie. Da DCs, wie schon angesprochen eine Hauptrolle bei der Präsentation von Fremdanitigenen den T-Zellen gegenüber besitzen [137], ist auch im Falle der Impfung mittels Übertragung der DNA durch *Listeria*, die effektive Transformation dieses Zelltyps und die anschließende Expression, Prozessierung und Präsentation dieses Antigens für die Erzeugung einer Immunantwort von zentraler Bedeutung. Da DCs sehr effizient Listerien phagozytieren [235, 265], und autolysierende Listerien sehr effizient Plasmid-DNA in Wirtszellen freisetzen [67, 235] müssen demnach die Gründe für die schlechte Aktivierung von OVA-spezifischen T-Zellen in der Expression des plasmidkodierenden Antigens und dessen Prozessierung zu suchen sein.

Frühere Arbeiten mit Plasmid-DNA-übertragenden Listerien konnten aufzeigen, dass der *in vitro* Transfer der EGFP-kodierenden Plasmid-DNA in antigenpräsentierenden Zellen sehr ineffizient ist, da nur sehr wenig EGFP-exprimierende Zellen ermittelt wurden [67, 94, 233]. Bestärkt wird dies in der Tatsache, dass auch andere Gruppen dies in ihren *in vitro* Experimenten mit *Lm* aufzeigen konnten [110, 124]. Nun könnte man spekulieren, dass nicht die eigentliche Freisetzung der Plasmid-DNA schlecht ist, sondern dass die Expression des plasmidkodierten Antigens sehr ineffizient war. Nachfolgend werden die Gründe hierfür diskutiert. Zum einen könnte der Abbau der Plasmid-DNA durch zytoplasmatische DNasen der limitierende Schritt gewesen sein, da DCs im Vergleich zu anderen Zelltypen sehr effizient Fremd-DNA oder Plasmid-DNA abbauen [179, 315]. Oder zum anderen, was auch wahrscheinlicher ist, war der Import der DNA in den Zellkern der limitierende Schritt. Der Import stellt für viele nicht-virale Transformationsverfahren einen limitierenden Faktor dar [178, 310], da der Kernimport größenabhängig ist. Normalerweise gelangen nur sehr kleine Moleküle durch die Kernporen. Da DNA-Moleküle aber in der Regel zu hochmolekular sind, kann es Probleme beim Import der Plasmid-DNA in den Zellkern geben [240, 216]. Andere MO, wie DNA-Viren [308] oder das Pflanzenpathogen *Agrobacterium tumefaciens* [299], welche DNA während ihres Infektionsverlaufes in den Nukleus einschleusen, haben das Problem des Kernimportes gelöst, in dem sie über spezielle Proteine verfügen, die den Transfer der genomischen DNA über die Kernporen unterstützen. Generell scheint es aber beim Transport über

die Nukleusmembran Schwierigkeiten zu geben [257]. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Zellen, die mit Lipopolyamin/Plasmid-DNA-Kernkomplexen transfiziert wurden, sind von 100 eingesetzten nur eine Plasmid-DNA im Zellkern nachgewiesen worden [174, 257]. Die Baktofektion ist ebenso abhängig vom Anteil mitotischer Zellen in der Zellpopulation [265]. Mitotische Zellen lassen sich leichter transfizieren als Zellzyklus-arretierte oder ruhende Zellen. Obwohl es auch Hinweise gibt, dass auch nicht-mitotische Zellen baktifiziert werden können, jedoch deutlich schlechter und ineffizienter [110]. Bei sich teilenden Zellen scheint die Dissoziation der Kernhülle während der Mitose der Schlüsselfaktor für den Kernimport zu sein [214, 35, 79]. DCs gehören dagegen zu nicht-teilenden Zellen, das wiederum unterstreicht die schlechte Effizienz der DNA-Übertragung in antigenpräsentierende Zellen wie DCs. Für nicht-phagozytierende, aber sich teilende Zellen scheint dagegen *in vitro* die Übertragung einer Plasmid-DNA das Mittel der Wahl zu sein. Es konnten immerhin über 5-20 % an EGFP-exprimierenden Zellen nach Freisetzung der EGFP-kodierenden Plasmid-DNA durch autolytische *Lm* nachgewiesen werden [235].

Ein weiterer Grund für die schlechte Aktivierung von antigenspezifischen Zellen durch DNA-übertragende *Lm* Stämme könnte der Wettlauf zwischen der Expression des kodierten Antigens und den zytotoxischen listeriellen Effekten sein. Die Baktofektion von DCs führte erst nach über 12 Stunden zu einer messbaren Expression von EGFP [265]. Die zytotoxischen Effekte dagegen setzen nach einer listeriellen Infektion schon sehr früh ein. Das Listeriolysin O zum Beispiel entfaltet schon nach 6 h *p. i.* seine Wirkung, das Auslösen eines Apoptoseprogrammes [114]. Dabei treten neben den direkten zytotoxischen Wirkungen auch die indirekten ein. So findet eine CTL-vermittelte Abtötung infizierter und damit potentieller transformierter DC innerhalb der ersten 24 h statt [311]. Sobald sich auch Listerien an die Zelle adhären oder phagozytiert werden, werden auch einige Wirtszellsignaltransduktionskaskaden aktiviert, die unterschiedliche Mechanismen auslösen: Anstieg von intrazellulärem Kalzium [104, 72], Aktivierung des Transkriptionsaktivators NF- κ B [156], Anstieg von Hitzeschockproteinen als Anzeichen eines zellulären Stresses [282] und vieles mehr. Theoretisch könnten diese Veränderungen innerhalb einer infizierten Zelle, innerhalb eines Zellgewebes zu verminderten Transfer von Plasmid-DNA in den Zellkern der Zellen führen. In diesem Zusammenhang wurde die Mutante *Lm* $\Delta trpS$ *hlyW491A* als Träger für die drei „Delivery“-Strategien untersucht. Diese Mutante $\Delta trpS$ *hlyW491A* sekretiert eine LLO-Variante, welche immer noch Listerien befähigt aus dem Phagosom zu entkommen, aber eine sehr geringe zytotoxische Aktivität (10 %) im Vergleich zum wildtypischen LLO besitzt [170]. Mit Hilfe dieser *Lm* Mutante *hlyW491A* konnte schon die Gruppe von S. Weiss einen effizienten *in vitro* Gentransfer des plasmidkodierten zystischen Fibrosisgens in Wirtszellen aufzeigen [170, 317]. Auch in dieser Arbeit konnte die Mutante als Überträger des OVA-Proteins und der OVA-mRNA eine klonale Expansion von OT-I Zellen induzieren. Der Protein-übertragende Stamm *Lm* $\Delta trpS$ *hlyW491A*/pSP118-PS_{actA}OVA zeigte dabei wieder die beste Effizienz, jedoch in geringerer als diejenige, welche mit dem WT Stamm *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-PS_{actA}OVA erreicht wurde. Aber zum ersten Mal konnte der Stamm *Lm* $\Delta trpS$ *hlyW491A* als Überträger der OVA-DNA eine kleine jedoch signifikante klonale Expansion von OT-I Zellen aktivieren. Letztendlich war diese Mutante zur Übertragung der DNA im Vergleich zum WT Stamm $\Delta trpS$ fähig. Demnach kann diese Studie einen Ausblick auf die Notwendigkeit der Herabsetzung der zytotoxischen listeriellen Effekte auf die Wirtszelle sein, damit die Expression des Antigens durch die Wirtszelle etabliert werden kann. Natürlich müssen zur

Vollständigkeit noch weitere Versuche mit dieser Mutante durchgeführt werden. Jedoch hatte die geringe zytotoxische Aktivität des LLO dieser Mutante eine negative Auswirkung auf die Effizienz des „Protein-Deliverys“. Der Protein-übertragende Stamm $\Delta trpS$ *hlyW491A*/pSP118-PS_{actA}OVA zeigte diesmal eine um 70 %-niedrigere Aktivierung der CD8 T-Zellen im Vergleich zum WT Stamm $\Delta trpS$ /pSP118-PS_{actA}OVA.

Ebenso könnte die Immunantwort gegen die Trägerbakterien einen negativen Einfluss auf die Etablierung einer Antigenpräsentation durch die listerielle Freisetzung der Plasmid-DNA haben. Die Gruppe um Serbina und Pamer hat herausgefunden, dass *Listeria*-spezifische aktivierte T-Zellen, sobald sie in ausreichender Menge vorhanden sind, ihre APC zerstören und auch das „Priming“ von weiteren T-Zellen verhindern [270]. Falls dies auch in den hier durchgeführten *in vivo* Experimenten zutraf, wurde durch die schnelle Etablierung der Immunantwort gegen *Listeria* die Prozessierung des OVA-Antigens aus dem „DNA-Delivery“ in Peptide und deren späteren Präsentation auf APC verhindert. Einen klaren Vorteil hat dabei die Freisetzung des Proteins durch *Listeria*. Das OVA, welches von *Listeria* exportiert wird, steht im Vergleich zu dem OVA, was als plasmidkodierte DNA übertragen wird, sofort als sogenanntes „listerielle Protein“ für die Präsentationsmaschinerie zur Verfügung und wird nun von potentiellen T-Zellen erkannt. Die DNA dagegen muss erst noch in den Zellkern transportiert werden, dort transkribiert, um anschließend im Zytosol translatiert und posttranslational modifiziert zu werden. Erst danach steht dieses Protein für den Abbau und zur Präsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle zur Verfügung.

Des Weiteren hatte eine andere Gruppe vor kurzem herausgefunden, dass freigesetzte DNA aus *Listeria* ins Zytosol der Wirtszelle Typ-1 Interferon aktiviert [285]. Typ-1 Interferon wird normalerweise bei Erkennung von Fremd-DNA durch Zelloberflächenrezeptoren wie Toll-Like Rezeptor TLR9 aktiviert. Damit stellen Typ-1 Interferone erste Instanzen der angeborenen Immunität dar. Aus dieser gewonnenen Erkenntnis der Aktivierung von Typ-1 Interferonen durch zytosolische DNA wird ersichtlich, dass das Immunsystem nicht nur durch seine Toll-like Rezeptoren auf der Zelloberfläche Fremd-DNA erkennen kann, sondern auch zusätzlich sehr viel später im Zytosol. Falls dies zutraf, könnte diese schnelle Aktivierung der angeborenen Immunität zu einer sehr schnellen adaptiven Immunität, zu einer schnellen Abtötung infizierter Zellen und dadurch zu einer schlechten Etablierung einer OVA-Expression durch die Anwendung der „DNA-Delivery“-Strategie geführt haben.

Die Expressionskassette des „DNA-Deliverys“ für EGFP, sowie auch für OVA steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Dieser zählt *in vivo* wie auch *in vitro* zu den stärksten Promotoren [10, 113]. Jedoch wurde nachgewiesen, dass die Transkription des CMV bei der Anwesenheit von IFN- γ *in vivo* [293] als auch *in vitro* [248] stark abnimmt. C. Schoen hat daraufhin IFN- γ inkubierte Zellen *in vitro* mit den EGFP-DNA-übertragenden *Listeria* infiziert. Jedoch konnte er keine Expressionsverringerung nachweisen [265]. Demnach scheint IFN- γ *in vivo* eher durch das verstärkte Abtöten der infizierten DCs einen Einfluss auf die Effizienz der DNA-Übertragung zu haben, als durch die Inhibierung des CMV-Promotors. Die schlechte Effizienz des „DNA-Deliverys“ könnte ebenso durch eine schlechte Invasivität des Stammes, einer ineffizienten bakteriellen Lysis oder einer Plasmiddegradation begründet werden. Diese drei Punkte wurden aber ausgeschlossen, da der „Delivery“-Stamm genauso gut in nicht-phagozytische, wie auch phagozytische im Vergleich zum WT eindrang, sich dort auch vermehrte und intrazellulär und interzellulär ausbreitete. Des Weiteren zeigte der Zusatz der Phagenlysinkassette eine effizientere Baktofektionsrate der EGFP-

Plasmid-DNA im Vergleich ohne Phagenlysinkassette [235]. Dies wurde noch durch die interzelluläre Ausbreitung der autolysierenden *Listerien* verstärkt [235]. Eine andere mögliche Erklärung des ineffizienten DNA-Transfers könnten Proteine bakteriellen oder wirtszelleigenen Ursprungs sein, welche sich im Zytosol an die freigesetzte Plasmid-DNA anhängen. Dadurch verhindern sie sterisch den Import in den Zellkern und die anschließende Transkription des kodierenden Antigens. Genau dieser Sachverhalt wurde schon von Zelmer *et al* beschrieben [317].

Ein entscheidender Hinweis, dass der Kernimport ein limitierender Faktor für das „DNA-Delivery“ darstellt, ist der *in vivo* Nachweis der Aktivierung von CD8 T-Zellen mittels der listeriellen Übertragung der RNA. Die Strategie des „RNA-Delivery“ ermöglicht die Umgehung des Kernimportes durch die Verwendung eines zytoplasmatischen Expressionssystems. Durch das „RNA-Delivery“ wird direkt eine antigenkodierende mRNA ins Zytosol der Wirtszelle übertragen, so dass diese unmittelbar danach zellkernunabhängig translatiert wird. Diese antigenkodierende mRNA wird schon innerhalb des Trägerbakteriums von der selbst-synthetisierten T7-RNA-Polymerase transkribiert und durch die beschriebene Autolysis des Trägerbakteriums freigesetzt. Außerdem kann durch die direkte Freisetzung der mRNA ins Zytosol der Zelle diese sofort translatiert werden, was wiederum zu einer schnelleren anschließenden Proteasom-abhängigen Degradation in geeignete Peptide führt, als mit der Freisetzung der Plasmid-DNA, die erst in den Zellkern transportiert werden muss. Zusätzlich zeigten *in vitro* Studien mit EGFP als Reportergen auf, dass eine schnellere und auch bessere Übertragung der EGFP-mRNA in Wirtszellen wie z. B. murine oder humane dendritische Zellen, als durch die Übertragung der EGFP-kodierenden Plasmid-DNA, erreicht wurde [266]. Auch die Präsentation eines Antigens durch murine Makrophagen konnte effizienter nach „RNA-Delivery“ als nach „DNA-Delivery“ *in vitro* nachgewiesen werden [265, 266]. Auch andere Gruppen veröffentlichten, dass *in vitro* die Übertragung von RNA in humane DCs besonders effektiv und der von Plasmid-DNA überlegen war [193, 236, 99]. Ein weiterer Vorteil der früheren Anwesenheit von transferierten antigenkodierenden mRNA oder Proteinen durch *Lm* ist, dass dadurch auch eine frühere Antigenpräsentation stattfindet und damit eine effiziente Generation von spezifischen T-Zell-Antworten *in vivo* erzielt werden kann [205, 12, 52]. Auch die Transfektion von unteilbaren Zellen wie DCs mit der mRNA resultierte in einer höheren Gentransfereffizienz und Genexpression als durch DNA-Transfektion [237, 236]. Demnach scheint die Übertragung der mRNA das Mittel der Wahl zu sein, um die Nachteile der Übertragung der DNA zu umgehen.

Um die erhaltenen *in vitro* und *in vivo* Daten zusammenzufassen, kann gesagt werden, dass virulenzattenuierte *Lm* Stämme als Überträger für biologisch aktive Moleküle wie Proteinantigene oder antigenkodierende Plasmid-DNA oder mRNA verwendet werden können. Welche Strategien („Protein-“, „DNA-“ und „RNA-Delivery“) und welche virulenzattenuierte Stämme dabei die besten für die jeweiligen therapeutischen Anwendungen sind, muss für jeden Fall gesondert untersucht werden. Für Vakzinierungszwecke scheint die „Protein-Delivery“-Strategie die Erfolgversprechendste zu sein, um gleichzeitig CD8 und CD4 T-Zell-Antworten zu generieren. Aber diese Strategie hat auch Grenzen, da nicht jedes gewünschte Proteinantigen von *Lm* exportiert werden kann und gewiss benötigen auch manche eukaryotische Proteinantigene eine Optimierung ihrer Sequenz an die prokaryotische Transkriptions- und Translationsmaschinerie [312]. Andere therapeutische

Anwendungen, in denen z. B. *Lm* für die Übertragung von Zytokinen verwendet wird, um die Immunantwort zu modulieren, kann nur durch den Transfer einer Zytokin-kodierenden Plasmid-DNA gelöst werden. Bis jetzt sind noch keine Studien bekannt, die eine Zytokinexpression durch Prokaryoten beschreiben. Auch unsere Gruppe verwendet im Kontext einer „gene-directed enzyme prodrug therapy of tumor tissues (GDEPT)“ das „DNA-Delivery“ um „Prodrug“-konvertierende Enzyme in die Tumorzielzelle einzuschleusen, um diese und das umliegende Tumorgewebe anschließend abzutöten (J. Stritzker). Erhaltene Daten zeigten auf, dass das „DNA-Delivery“ hier eindeutig effizienter war, als das „Protein-Delivery“. Demnach hat jede „Delivery-Strategie“ mit *Lm* ihren eigenen Vorteil und Nutzen.

6.3 Die Rolle des Phagenlysin für die drei Vakzinierungsstrategien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenso die Rolle des Phagenlysin *ply118* für die drei Vakzinierungsstrategien näher charakterisiert. Wie in vorangegangenen Arbeiten festgestellt wurde, ermöglichte das Phagenlysin unter der Kontrolle des *actA*-Promotors ($P_{actA-ply118}$) auf dem über *trpS*-stabilisierten Transferplasmid („balanced-lethal“ Plasmid-System) eine effiziente Freisetzung der Plasmid-DNA und mRNA innerhalb des Zytoplasms der Wirtszelle durch die Zerstörung der bakteriellen Träger [67, 235, 266]. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde eine effiziente Freisetzung der mRNA in das Zytoplasma von Wirtszellen mit anschließender Präsentation des OVA's über MHC-Klasse-I-Moleküle durch autolyisierende Bakterien festgestellt. Zusätzlich gewährleistet das „balanced-lethal“ Plasmid-System, welches zu 100 % stabil *in vitro* wie auch *in vivo* ist, dass sich in jedem Bakterium eine Lysis-Kassette in hoher Kopienzahl befindet, welche es letztendlich abtötet. Durch diese Kombination der 100 %igen Plasmid-Stabilität und der lethalen Lysinkassette in hoher Kopienzahl wurde eine besonders hohe Virulenzattenuation des *Lm* Stammes $\Delta trpS$ in Mäusen nach oraler [235] und nach intravenöser Applikation im Vergleich zum WT nachgewiesen. Jedoch wurde *in vivo*, wie auch schon *in vitro* Experimenten [233, 235] mit autolyisierenden Bakterien nachgewiesen wurde, festgestellt, dass die Phagenlysin-Kassette in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich aktiv ist. In Lebern von infizierten Mäusen schien das Phagenlysin, aufgrund der höheren Anzahl an autolyisierenden Bakterien, weniger aktiv zu sein, als in den infizierten Milzen. Warum das Phagenlysin in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich aktiv ist, ist nicht bekannt. Für Milzen könnte spekuliert werden, dass durch die bakteriziden Aktivitäten von residenten und zirkulierenden Makrophagen in den Milzen ein Teil der Bakterien abgetötet wird. Dadurch kommt das angereicherte Phagenlysin aus diesen abgetöteten Bakterien heraus und hilft bei der weiteren Abtötung lebender Bakterien. Die natürliche Wirkweise des Phagenlysin ist die Aufspaltung der Aminosäureketten zwischen den L-Alanin und D-Glutamatresten der Peptidoglykanschicht [187]. Demnach ist das Phagenlysin eine sehr spezifische L-Alanyl-D-Glutamat-Peptidase, die nur ihr Substrat in der Peptidoglykanschicht erreichen kann, wenn eine Pore in der Zellmembran vorhanden ist. Bis jetzt ist noch keine spontane Translokation des Phagenlysin über die Zellmembran eines gesunden Bakteriums bekannt [191]. Unter normalen Umständen einer Phageninfektion, hilft das Protein Holin beim Austritt des Phagenlysin aus dem Zytoplasma des Bakteriums, in dem es eine Pore in der Zytoplasmamembran bildet [191]. Daher ist nicht klar, wie das mit Hilfe des *actA*-Promotors exprimierte Phagenlysin, welches kein

Signalpeptid besitzt, ohne die Hilfe des Holins wirken kann. Zusätzlich sind Phagenlysine Enzyme, die in Sekunden ihre Wirkung entfalten. Da aber nach 3 Tagen immer noch Bakterien in den infizierten Mäusen zu finden waren, scheint das Lysin die intrazellulären Bakterien entweder nur teilweise oder nur stark verzögert abzutöten. Deshalb müssen noch andere Faktoren zu einer effizienten Freisetzung der Plasmid-DNA oder mRNA in antigenpräsentierende Zellen beigetragen haben. Ebenso kann auch nicht der Level des Transkriptionsfaktors PrfA, welcher den *actA*-Promotor aktiviert, der limitierende Faktor der Autolysis sein, da autolysierende im Vergleich zu nicht-autolysierenden wildtypischen Listerien keine Unterschiede in ihrem Wachstum bei Kultivierung in BHI aufzeigten [233].

Aber in Hinsicht auf die Sicherheit von lebenden Impfstoffträgern, sind Ply118-exprimierende Bakterien für spätere klinische Studien ungeeignet. Ply118-exprimierende Bakterien in einer Dosis von 5×10^3 erzielten zwar eine Virulenzattenuation *in vivo*, doch weitere *in vivo* Ergebnisse zeigten auf, dass erst eine hohe Dosis von 5×10^7 ($0.25-0.5 \times LD_{50}$) die beste Applikationsdosis für die *Lm* Trägerstämme zur Freisetzung von OVA als Protein oder mRNA ist, um am effizientesten eine Präsentation der Ovalbuminpeptide 257-264 über MHC-Klasse-I Moleküle mit nachfolgender Erkennung und Expansion der transferierten OVA-spezifischen T-Lymphozyten zu bewirken. Bei dieser Dosis 5×10^7 wurden jedoch mehr autolysierende Bakterien im Vergleich zu wildtypischen Bakterien (Applikationsdosis 5×10^3) in Lebern von infizierten Mäusen nachgewiesen. Diese autolysierenden Bakterien zerstörten sogar viele Leberzellen, wie anhand der Bestimmung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) im Serum infizierter Tiere nachgewiesen wurde. Anhand der *in vivo* Daten konnte gezeigt werden, dass sich autolysierende Bakterien intrazellulär vermehrten. Solch eine Zunahme an intrazellulären autolysierenden Bakterien wurde auch schon *in vitro* in verschiedenen Zelllinien beobachtet [288, 233].

Trotz der ineffizienten Abtötung der intrazellulären Bakterien durch das Phagenlysin hatte dieses Lysin jedoch einen positiven Einfluss auf die „Protein-Delivery“-Strategie. Anhand von einigen durchgeführten adoptiven Transferexperimenten wurde festgestellt, dass in Mäusen, welche 5×10^3 ($0.5 \times LD_{50}$) nicht-autolysierende, OVA-exportierende *Lm* $\Delta trpS/pSP0-PS_{actA}OVA$ appliziert bekommen hatten, nur ca. 1 % an proliferierenden und aktivierenden OT-I Zellen aufzufinden waren. Dagegen zeigte die Mausgruppe, die mit autolysierenden, OVA-exportierenden *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$ in gleicher Infektionsdosis von 5×10^3 infiziert wurde, keine Proliferation und Aktivierung von OT-I Zellen. Zusätzlich wurden einer dritten Mausgruppe 5×10^7 autolysierenden OVA-exportierenden Listerien appliziert. In dieser Gruppe konnte im späteren Versuchsverlauf sehr effiziente Häufigkeiten an aktivierten und proliferierenden CD8 T-Zellen durchflußzytometrisch nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass es vorteilhaft ist, so viele Listerien wie möglich zu applizieren, so dass mehr Ovalbumin exprimiert und exportiert wird. Weitere Experimente belegten, dass erst ab einer Applikationsdosis von 5×10^6 ein sehr effizientes „Priming“ nach Transfer des Proteins oder der RNA durch autolysierende Bakterien nachweisbar war. Auch andere Gruppen konnten eine direkte Abhängigkeit im „Priming“-Prozeß zwischen der CD8⁺ T Zellexpansion, der Infektionsdosis so wie der Menge des Antigens, das den CD8⁺ T-Zellen präsentiert wird, aufzeigen [211, 12]. Der signifikante Erfolg von 1 % der nicht-autolysierenden *Lm* $\Delta trpS/pSP0-PS_{actA}OVA$ zeigte aber auch auf, dass eine Ply118-vermittelte Autolysis der Trägerbakterien *Lm* $\Delta trpS/pSP118-PS_{actA}OVA$ in einer Applikationsdosis von 5×10^3 keine zusätzliche Freisetzung des Ovalbumin Proteins zur Folge hatte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Autolysis der Trägerbakterien keine Auswirkung auf die vermehrte Freisetzung des exportierten Ovalbumins in Bezug auf ein einzelnes Trägerbakterium hatte. Sie war aber in der Hinsicht vorteilhaft, dass durch das Vorhandensein der Autolysis der Trägerstamm *Lm* $\Delta trpS$ /pSP118-PS_{actA}OVA virulenzattenuierter ist als der WT Stamm und deshalb um 4 Log mehr von diesem in die Maus appliziert werden konnte und demnach auch mehr OVA-Proteine freigesetzt und damit eine effizientere Aktivierung von OVA-spezifischen T-Lymphozyten generiert wurde.

6.4 Die Charakterisierung der *Lm* $\Delta(trpS aroA aroB)$ -Mutante als neuer Impfstoffträger

Da das intrazelluläre Wachstum der autolysierenden $\Delta trpS$ Stämme für die Funktion als Impfstoffträger ungeeignet ist, wurde die $\Delta(trpS aroA aroB)$ -Mutante als Impfstoffträger näher charakterisiert. Diese Mutante besitzt Deletionen von Genen, welche für zwei Enzyme kodieren, die für die Synthese von aromatischen Aminosäuren benötigt werden. Da das Deletieren der Gene auch auf Schlüsselkomponenten der aeroben Atmung (Menachinon) Auswirkungen hatte, können diese Mutanten nur noch anaerobe Atmung vollziehen. Diese metabolischen Defizite führten zu einer starken Virulenzattenuation *in vivo* im Vergleich zum WT [289]. Des Weiteren zeigten autolysierende $\Delta(trpS aroA aroB)$ -Mutanten zwar nur eine kleine Reduktion in den bakteriellen Anzahlen in Lebern von infizierten Mäusen, jedoch wurde eine geringere Zerstörung der Leberzellen anhand der GPT-Konzentration im Serum dieser Tiere im Vergleich zu Tieren, welche autolysierenden WT $\Delta trpS$ Stämme appliziert bekommen hatten, nachgewiesen. Ebenso erzielten autolysierende $\Delta(trpS aroA aroB)$ -Mutanten nach Freisetzung von OVA in Form von DNA und Protein eine effiziente MHC-Klasse-I-Präsentation mit nachfolgender Aktivierung und Proliferation von OT-I Zellen in vergleichbaren Werten zu denen, die nach Infektion mit autolysierenden WT $\Delta trpS$ Stämmen erreicht wurden. Auch hier stellte sich wieder die „Protein-Delivery“-Strategie als die effizienteste heraus.

Die „RNA-Delivery“-Strategie konnte dagegen in dieser Mutante nicht getestet werden. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass die *aroA*-Mutante sowie auch die Doppelmutante *aroA/aroB*-Mutante bei Kultivierung im Vollmedium als auch bei der intrazellulären Replikation eine erhöhte Generationszeit aufweisen [289]. Auch für das Replizieren des Zwei-Plasmid-Systems für das „RNA-Delivery“ benötigt *Listeria* schon eine längere Generationszeit und einen höheren Stoffwechsel [266]. Die Kombination aus beiden erforderte nun wahrscheinlich sehr viel mehr Stoffwechsellistung und -energie, zu der *Listeria* nicht mehr fähig war. Darum konnte kein „RNA-Delivery“ im Hintergrund einer *aroA/B*-Mutation untersucht werden. Aber anhand der gewonnenen *in vivo* Daten stellt die $\Delta(trpS aroA aroB)$ -Mutante ein viel versprechender Träger des „Protein-Deliverys“ dar.

6.5 Die kompartiment-spezifische und bakterielle Expression des Antigens beeinflusst die Effizienz der primären Aktivierung von CD4 T-Lymphozyten aber nicht von CD8 T-Lymphozyten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, wie sich die bakterielle und kompartiment-spezifische Expression des OVA's auf die primäre Aktivierung von T-Zellen auswirkt. Es ist vorstellbar, dass eine erfolgreiche Freisetzung von bakteriell-hergestellten, heterologen Proteinantigenen eine Präsentation dieser in geeigneter Form und deren Freisetzung in geeignete Kompartimente des Immunsystems benötigt. Es gibt aber bis lang noch keine eindeutigen Daten darüber, auf welche Art und Weise man diese heterologen Antigene von Listerien exprimieren lässt, um eine effiziente Antigenpräsentation mit nachfolgender Antigen-spezifischer T-Zell-Aktivierung zu induzieren. Aus Literaturrecherchen ist bekannt, dass eine sehr effiziente Präsentation von Proteinantigenen über MHC-Klasse-Moleküle letztendlich auch zu einer besseren und schnelleren T-Zell-Antwort führt [141]. In diesem Zusammenhang wurde außerdem festgestellt, dass die Antigenlokalisierung eine wichtige Rolle spielt, da intrazellulär verbleibende Antigene zu keiner Protektion führten, wohingegen exportierte Antigene zu einer effizienten Protektion führten [94]. Auch der Expressionslevel des heterologen Antigens beeinflusst sehr stark die Immunreaktion, die gegen den Träger gerichtet ist [94]. Deshalb wurde in dieser Arbeit darauf geachtet, dass die Expression des Antigens stabil und das Antigen selbst auch in seiner nativen aktiven Form vorliegt. Außerdem beschreiben Kaufmann und Kollegen, dass effektive Impfstoffe möglichst rasch nach der Infektion/Applikation protektive T-Zell-Antworten mit CD8 und CD4 T-Zellen auslösen sollten [155]. Dies könnte am besten mit exportierten Antigenen gewährleistet werden. Des Weiteren sollten effektive Impfstoffe auch eine langanhaltene Immunantwort induzieren, und das wiederum bedeutet, dass Antigene über einen längeren Zeitraum freigelassen werden müssen. Dies kann sehr gut von intrazellulär verbleibenden Antigenen gewährleistet werden. Auch die Exposition von heterologen Antigenen auf der Oberfläche von bakteriellen Impfstoffträgern führte in einer Reihe von unterschiedlichen Modellsystemen zur Induktion einer potenten systemischen wie auch mukosalen humoralen Immunantwort [155, 262].

Ebenfalls war noch unklar, in welchem Kompartiment der Wirtszelle die Antigenpräsentation stattfinden sollte, damit nachfolgend effiziente protektive T-Zell-Antworten generiert werden. Im Allgemeinen werden Antigene, welche in das phagosomale Kompartiment exportiert werden von MHC-Klasse-II Molekülen prozessiert, präsentiert und deshalb hauptsächlich von CD4⁺ T-Zellen erkannt. Antigene, welche in das Zytosol freigesetzt werden, werden dagegen über dem MHC-Klasse-I-Weg den CD8⁺ T-Zellen präsentiert [141].

Demnach ist es für Vakzinierungszwecke entscheidend, die Art und Weise der Antigenexpression, die Stabilität des Antigens, sowie die Lokalisierung des Antigens durch den Träger festzulegen, da dies den Typ und die Stärke der gegen das Antigen gerichteten Immunantwort beeinflusst [68].

Deshalb wurde der direkte Vergleich desselben Antigens, welches von den Trägerbakterien in Form von zellwandverankerten, exportierten oder intrazellulär verbleibenden Polypeptiden in verschiedene Kompartimente freigesetzt wird, angestrebt. Dafür wurden rekombinante *Lm* Δ (trpS *aroA aroB*) Stämme konstruiert, welche ein verkürztes Ovalbumin bestehend aus den aa 145-386, als exportiertes, zellwandverankertes oder intrazellulär verbleibendes Protein exprimieren.

Gleichzeitig sind alle drei unterschiedlich-exprimierten OVA-Proteine jeweils unter der Kontrolle listerieller Promotoren P_{actA} und P_{hly} kloniert, welche in den zellulären Wirtskompartimenten Phagosom und Zytosol unterschiedlich verstärkt aktiviert werden [36, 212]. Das *hly*-Gen wird vor allem aktiv im phagosomalen Kompartiment exprimiert, wohingegen *actA* hauptsächlich intrazellulär im Zytosol aktiv exprimiert wird [36]. Der Export der Ovalbumine wird durch die entsprechenden Signalpeptide der Gene *actA* und *hly* gewährleistet. Für die Expression der zellwandverankerten Ovalbumine wurde zusätzlich an die kodierende OVA-Sequenz der C-terminale Bereich des *inA*-Gens angehängt. Dieser C-terminale Bereich des *inA*-Gens kodiert ein sogenanntes Zellwandverankerungssignal, bestehend aus einem konservierten LPXTG-Motif, gefolgt von einem hydrophoben Bereich und einem Schwanz aus positiv geladenen Aminosäuren [66]. Das LPXTG-Motif wird von einer Sortase erkannt, die als Transpeptidase wirkt, in dem sie das LPXTG-Motif (X= irgendeine AS) zwischen Threonin- und Glycinresten aufspaltet und nach Translokation über die Zellmembran kovalent mit der Zellwand verankert [41, 90]. Damit wurde das heterologe Antigen wie ein klassisches listeriell Oberflächeprotein nach außen hin exponiert. Aufgrund der universellen Verbreitung [120, 65] bot sich dieses LPXTG-Ankermotiv für eine kovalente Verankerung heterologer Antigene in der Zellwand Gram positiver Bakterien an, wie Studien an Gram positiven dies schon belegten (zusammengefasst in [45]). Auch *Lm* kodiert von den 133 Oberflächen-proteinen 41 LPXTG Proteine [41].

Zur Beantwortung der Fragestellung, wie sich die bakterielle und kompartiment-spezifische Expression des OVAs auf die primäre Aktivierung von T-Zellen auswirkt, wurden nur nicht-autolysierende *Lm* $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ Stämme verwendet. Wie schon ausführlich beschrieben, verbesserte der Zusatz des Phagenlysin die Strategie des „Protein-Deliverys“ nur durch die Virulenzattenuation dieser Trägerstämme. Da die verwendete Mutante $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)$ aufgrund der Deletion zweier wichtiger Stoffwechselfgene, die für die Synthese aromatischer Aminosäuren benötigt werden, *in vivo* virulenzattenuiert ist [289], konnte diese auch ohne Zusatz des Autolysissystems in einer um 4 Log höheren Dosis als die entsprechende Dosis (5×10^3) für nicht-autolysierenden WT Stämme $\Delta trpS$ in C57BL/6-Mäusen appliziert werden. Zur quantitativen Beantwortung der Fragestellung wurden wieder adoptive Transferexperimente mit TCR-transgenen CD8 (aus OT-I Mäusen) und CD4 T-Zellen (aus OT-II der DO1011 Mäusen) durchgeführt. Es wurde nachgewiesen, dass die Expression des OVA-Proteins als intrazellulär verbleibendes, zellwandverankertes oder exportiertes Antigen durch die Trägerbakterien keinen Unterschied für die Aktivierung und Proliferation von CD8 T-Zellen macht. Ebenso beeinflusste die Expression des OVAs innerhalb des Phagosoms oder innerhalb des Zytosols nicht die primäre Aktivierung der OVA-spezifischen CD8 T-Lymphozyten. Jedoch beeinflusste die bakterielle Lokalisierung und die kompartiment-spezifische Expression des heterologen Antigens Ovalbumin die primäre Aktivierung von OVA-spezifischen CD4 T-Lymphozyten. Welche Gründe für diese unterschiedliche Aktivierung von OVA-spezifischen CD8- und CD4 T-Lymphozyten durch die jeweiligen Protein-übertragenden Stämme liegen, wurde versucht anhand der *in vitro* Charakterisierung dieser Stämme zu ergründen.

Den unterschiedlichen *Lm* „Protein-Delivery“-Stämmen $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-PS_{actA}OVA$ -Anker, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-P_{actA}OVA$, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0-$

PS_{hly}OVA, $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$ -PS_{hly}OVA-Anker und $\Delta(trpS\ aroA\ aroB)/pSP0$ -P_{hly}OVA war es möglich OVA zu exprimieren und es nachfolgend richtig zu lokalisieren (Export, Zellwandverankerung, Intrazellulärität), wie es anhand der Westernblots nachgewiesen werden konnte. Dabei zeigten Stämme, die OVA unter der Kontrolle des *hly*-Promotors exprimierten eine deutlich stärkere Expression. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass durch die gesteigerte Expression der unterschiedlichen Ovalbumine diese *aroA/B* Stämme bei Kultivierung in BHI mit Amberlite™ XAD-4 mit der Zeit ein Wachstumsdefizit, im Vergleich zum WT, aufzeigten. Da die OVA-Expression unter der Kontrolle PrfA-abhängiger Promotoren steht, ist die gesteigerte Expression des OVAs und das damit resultierende langsamere Wachstum der Stämme auf die PrfA-abhängige Genexpression zurückzuführen, die durch den Zusatz des Amberlite™ XAD-4 zu BHI aktiviert wird [78]. Im BHI ohne Amberlite™ XAD-4 wurde das langsamere Wachstum der Stämme nicht nachgewiesen. Ebenso konnte nur eine sehr schwache Expression der Ovalbumine in Zellextrakten der *aroA/B* Stämme bei Kultivierung in reinem BHI nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Aber dennoch zeigten Stämme, die OVA unter der Kontrolle des *hly*-Promotors exprimierten, eine deutlich stärkere OVA-Expression. PrfA-abhängige Gene werden nur sehr schwach in Kulturmedium bei 37 °C exprimiert, dagegen sehr stark in Wirtszellen [147]. Diese Tatsachen sprechen wiederum für einen weiteren Mechanismus der *in vivo* auf die Expression induzierend wirkt [247] und das in dieser Arbeit teilweise durch den Zusatz des Amberlite™ XAD-4 nachgespielt wurde. Die Stämme, bei denen OVA unter der Kontrolle des *hly*-Promotors exprimiert und zellwandverankert oder exportiert wurde, zeigten vor allem ein langsames Wachstum, gefolgt von den Stämmen, die OVA unter der Kontrolle des *actA*-Promotors exprimierten und zellwandverankerten oder exportierten. Auch zeigten Stämme, die das Ovalbumin exportierten eine erhöhte Expression des Ovalbumins. Zusätzlich schien das exportierte Ovalbumin noch in der Zellwand festzustecken. Demnach setzen die Zellwandverankerung und auch der Export der heterologen Antigene mit steigender Expressionsstärke des heterologen Antigens die Wachstumsgeschwindigkeit und damit wahrscheinlich auch die Fitness der rekombinanten Listerien im Kulturmedium herab.

Diesen Zusammenhang der gesteigerten Expression des Antigens und der daraus resultierenden geringeren Wachstumsgeschwindigkeit und Fitness wurde noch besser an Invasions- und Replikationsassays mit Epithelzellen nachgewiesen. Auch in diesen Assays wurde festgestellt, dass sobald OVA von den Listerien exportiert oder zellwandverankert exprimiert vorlag, dies auch einen negativen Einfluss auf die Invasion und Replikation in nicht-phagozytischen Zellen hatte. Auffallend war ferner, dass nun besonders die Stämme, bei denen die OVA-Expressionskassette unter der Kontrolle des *actA*-Promotors standen, einen verstärkten negativen Einfluss auf die Invasions- und Replikationsfähigkeit zeigten. Die schlechte InIA-abhängige Invasion in Epithelzellen, wie CACO-2, kann darauf zurückgeführt werden, dass durch die Expression großer Mengen verankerter und exportierter OVA-Polypeptide (exportiertes Protein blieb teilweise in der Zellwand stecken) weniger InIA in der Zellwand exprimiert wurde (nicht gezeigt und [265]). Auch für *E. coli* wurde bereits beschrieben, dass eine massive Integration fremder Proteine den geordneten Aufbau der bakteriellen Zellmembran und/oder Zellwand stört [95, 284]. Auch Invasions- und Replikationsexperimente, welche mit Makrophagen durchgeführt wurden, zeigten auf, dass Makrophagen Probleme beim Phagozytieren dieser Stämme hatten. Generell wurden Stämme, welche OVA unter

der Kontrolle des *hly*-Promotors exprimierten, besser phagozytiert als Stämme welche OVA unter der Kontrolle des *actA*-Promotors exprimierten.

Dieser Unterschied zwischen dem extrazellulären und intrazellulären Verhalten der einzelnen Protein-übertragenden Stämme hängt mit den verwendeten listeriellen Promotoren der Gene *actA* und *hly* für die OVA-Expressionskassetten ab. Der Transkriptionslevel von *hly* ist 10-mal höher in Kulturmedium wie LB oder BHI im Vergleich zum *actA*-Transkriptionslevel [212]. Dies erklärt auch die erhöhten OVA-Expressionslevel und die Wachstumsverzögerung derjenigen Stämme, welche OVA unter der Kontrolle des *hly*-Promotors exprimierten. Auch der Zusatz des Amberlite™ XAD-4 konnte daran nichts ändern. Der Expressionslevel der listeriellen Virulenzgene, zu dem auch *actA* oder *hly* gehören, ist abhängig von der Menge des positiven Regulatorproteins PrfA [203, 42, 84]. Demnach müssen PrfA-abhängige Gene intrazellulär anders reguliert werden als extrazellulär. Es ist bekannt, dass die intrazelluläre Aktivierung von PrfA-Genen ein komplexer Prozess ist, der multiple Schritte benötigt, wie erhöhte Expression des PrfAs, Aktivierung von PrfA und Aktivierung oder Induktion eines sekundären bakteriellen Faktors (oder Faktors) innerhalb des Zytosols [278].

Auch die erhaltenen Ergebnisse der langsamen Replikation der Stämme, welche OVA unter der Kontrolle des *actA*-Promotors exprimierten können dadurch erklärt werden, dass *actA* sehr aktiv im Wirtszellzytosol von z. B. 774 Makrophagen (226-fach) exprimiert wird, wohingegen *hly* eher intrazellulär gemäßigte Expressionslevel zeigt (20-fach) [212]. Außerdem ist das ActA Protein eines der meisten intrazellulär gemachten Proteine im Zytosol, das jedoch minimal im Kulturmedium exprimiert wird [34, 28]. Das *hly*-Gen wird dagegen vermehrt nach Eintritt ins phagosomale Kompartiment exprimiert. Demnach kam es wahrscheinlich zu einer Beeinträchtigung der Fitness dieser Stämme durch den gesteigerten intrazellulären OVA-Expressionslevel. Außerdem erklären auch die Funktionen der ActA und LLO-Proteine, deren unterschiedliche Expressionslevel und damit auch die unterschiedliche Aktivierung ihrer Promotoren im Zytosol oder im Phagosom. ActA wird zur Nukleation des Aktins benötigt, damit das Bakterium sich intra- und interzellulär ausbreiten kann, wohingegen das porenformende Toxin LLO zur Öffnung der Phagosomenmembran benötigt wird [302]. Des Weiteren wird dem ActA auch eine Rolle bei der Internalin-unabhängigen Aufnahme in Wirtszellen zugesprochen [5, 290]. Dies gibt wiederum Hinweise darauf, dass der *actA*-Promotor PrfA-abhängig schon bei Zellkontakt aktiviert wurde. Bekannt ist, dass die Adhärenz des Bakteriums an die Wirtszelle die PrfA-Produktion stimuliert und dass diese innerhalb der Zelle weiter angeregt wird [246]. Dieser Sachverhalt könnte erklären, warum die Stämme, welche OVA unter der Kontrolle des *actA*-Promotors exprimierten und damit eine gesteigerten OVA-Expressionslevel hatten, geringere Invasionsfähigkeiten aufwiesen, als Stämme, welche OVA unter der Kontrolle des *hly*-Promotors exprimierten. Ebenso könnten die Invasions- und Replikationsdefizite oder die generelle schlechte Fitness der Listerien daher rühren, dass die OVA-Expressionskassette auf einem „Multi Copy Plasmid“ vorliegen. In einigen Studien wurde festgestellt, dass eine Titration verfügbares PrfA durch multiple Kopien der *hly*-Bindungsdomäne stattfand und dass schließlich in der reduzierten Transkription der PrfA-abhängigen Gene in *Lm* resultierte [42, 27]. „Extra Single Copy“ ,wie es im Chromosom vorkommt, zeigte dagegen nicht diesen Titrationseffekt [278].

Die bisher diskutierten Ergebnisse demonstrierten, dass die verwendeten OVA-exprimierenden *aroA/B* Stämme langsamer wachsen, in Wirtszellen schlechter invadieren und langsamer intrazellulär replizieren, sobald das heterologe Protein Ovalbumin verstärkt exprimiert wurde.

Demnach scheint die Fitness des Trägerbakteriums unter der Expression des OVAs beeinträchtigt zu werden. Und dies scheint Auswirkung auf die primäre Aktivierung von OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, jedoch nicht auf die Aktivierung von OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, gehabt zu haben.

Da schon mehrfach beschrieben wurde, das *Listeria* als Impfstoffträger hauptsächlich eine CD8 T-Zell-abhängige Antwort auf verschiedene heterologe Proteinantigene auslöste [105, 281] und da es sich beim Träger um ein intrazelluläres replizierendes Bakterium handelt, kann man sich vorstellen, das *Listeria* vermehrt die MHC-Klasse-I-Präsentationsmaschinerie aktiviert. Auch die erhaltenen *in vivo* Daten bestätigten die Literaturangaben der vermehrten Präsentation der heterologen Antigene über MHC-Klasse-I-Moleküle, da das 2- 3-fache an klonaler Expansion von CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen aktiviert wurde. Ebenso gibt es Hinweise, das das PrfA Regulon sehr stark intrazellulär aktiviert wird [246]. Da alle Virulenzgene des Virulenzgenclusters, zu dem auch die Gene *actA* und *hly* gehören, PrfA-abhängig sind, wurde OVA unter der Kontrolle beider Promotoren intrazellulär gemacht [302].

Des Weiteren hängt die Zugänglichkeit von bakteriell-exprimierten Antigenen in die Antigenpräsentation von der Überlebensfähigkeit der Bakterien ab. Solange Bakterien leben, können sie Antigene exprimieren, aktiv exportieren und zellwandverankern. Intrazellulär verbleibende Proteine dagegen können nur freigesetzt werden, wenn Bakterien absterben, da die Zytoplasmamembran und die Zellwand eine natürliche Barriere darstellen [153]. Diese Barriere können Proteine, welche natürlicherweise nicht exportiert werden, nicht überwinden [279]. Während der listeriellen Infektion werden über 50 % Listerien im Phagosom abgetötet [298]. Der Rest, der sich aus dem Phagosom mit Hilfe des LLO und der beiden Phospholipasen befreite, replizierte nun ungehindert im Zytosol, wie auch in *in vitro* Experimenten beobachtet wurde. Diese Replikation oder Lebensfähigkeit der Bakterien führt auch zur Expression des OVAs und damit zu dessen Prozessierung und Präsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle an CD8 T-Zellen. Gleichzeitig aktiviert die Ansäuerung des Phagosoms auch zahlreiche Proteasen, die nun ihrerseits bakterielle Proteine in Peptide zerlegen. Diese prozessierten phagosomalen Peptide können anschließend an MHC-Klasse-II-Moleküle binden, zur Oberfläche transloziert und den CD4 T-Zellen präsentiert werden [141]. Die erhaltenen effizienten Werte der klonalen Expansion von OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, welche durch die Stämme induziert wurden, die OVA unter der Kontrolle des *hly*-Promotors im Phagosom exprimiert hatten, spiegeln dies wieder. Die exportierten Antigene wurden dabei am besten präsentiert. Auch die Stämme, welche OVA unter dem *actA*-Promotor exprimiert hatten, aktivierten eine effiziente Antigenpräsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle. Besonders Stämme, die OVA exportierten, gefolgt von den Stämmen, welche OVA zellwandverankerten, induzierten eine effiziente klonale CD4 T-Zell-Population. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der *actA*-Promotor wahrscheinlich auch PrfA-abhängig bei Zellkontakt durch die Zelle aktiviert wurde, wie von anderen Forschungsgruppen bewiesen wurde [5, 290]. Demnach lag exportiertes und auch zellwandverankertes OVA im Phagosom vor.

Die bakterielle Lysis im Phagolysosom stellt außerdem einen Mechanismus für OVA-Proteine dar, in den MHC-Klasse-I-Weg durch „cross presentation“ Ereignisse zu kommen. Dadurch könnte auch indirekt die OVA-Präsentation über den MHC-Klasse-I-Weg verstärkt werden. Da auch Stämme, welche phagosomal-exprimierte OVA-Proteine freisetzen, eine genauso gute Aktivierung von CD8 T-Zellen induzierten, könnte man daraus Rückschlüsse für eine „cross presentation“ ziehen. Unter

„cross presentation“ versteht man den Prozess, der es den APC ermöglicht, extrazelluläre Antigene im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen den CD8 T-Zellen zu präsentieren [83, 20, 57, 251]. Bisher sind zwei Mechanismen bekannt, wie das internalisierte extrazelluläre Antigen von den APC prozessiert wird. Entweder wird das Antigen aus dem Phagosom ins Zytosol transferiert, wo es Proteasom-abhängig prozessiert, TAP-abhängig ins ER transportiert und schließlich an MHC-Klasse-I-Moleküle im ER oder Phagosom gebunden wird („Zytosol-abhängiger Weg“) [166]. Oder prozessierte Peptide werden auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen, die aus degradierten Proteinen in Endosomen/Lysosomen entstanden sind („Zytosol-unabhängiger Weg“) [146]. Durch die bakterielle Lysis gelangen besonders nicht exportierte Proteine in den MHC-Klasse-I-Weg [274], da durch das Absterben der Bakterien diese nun freigesetzt werden. Auch exportierte Antigene, welche im Phagosom prozessiert wurden, können über MHC-Klasse-I Moleküle präsentiert werden [321]. Eine neuere Studie, welche *Lm* Stämme verwendete, die nicht mehr aus dem Phagosom entkamen, konnte ebenso eine sehr effiziente Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle nachweisen [29]. Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit die jeweiligen OVA-Expressionskassetten so konstruiert, dass die OVA-Sequenzen nur noch aus den aa 145-386 bestanden. Im Vergleich zum nativen Ovalbumin fehlte die interne Signalsequenz. Einige Studien belegten, dass so ein verkürztes OVA-Konstrukt nicht ins umliegende Wirtsmilieu exportierbar war und dadurch einen besseren Zugang zum proteasomalen Abbau und der MHC-Klasse-I-Präsentationsmaschinerie und zu „cross presentation“ Ereignissen hatte [185, 259, 276]. Darüber hinaus wurde in den adoptiven Transferexperimenten festgestellt, dass die bakterielle Belastung der Leber nach *i. v.* Infektion mit den OVA-Stämmen im Vergleich zu WT Stämmen herabgesetzt war. Demnach muss ein Abtöten von infizierten OVA-präsentierenden Zellen durch CTLs stattgefunden haben. Auch absterbende infizierte Zellen dienen als Quelle zur „cross-presentation“ von Antigenen [251]. Dabei spielen Makrophagen für die Prozessierung und Präsentation von exogenen Antigenen im Kontext von CD8-T-Zellen in der listeriellen Infektion eine wichtige Rolle [146].

Diese *in vivo* gewonnenen Daten könnten vielleicht Hinweise darauf geben, warum vor allem exportierte Antigene zu einer protektiven CD8 T-Zell-Antwort führten [122, 275, 274, 155]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass vor allem exportierte Antigene, egal unter welchem Promotor (P_{actA} und P_{hly}), oder in welchem Kompartiment das Antigen freigesetzt wurde, am effektivsten eine Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Moleküle mit nachfolgender klonaler Expansion von CD8 und CD4 T-Zellen induzierten. Dabei zeigte sich eine höhere klonale Expansion an CD8 als CD4 T-Zellen. CD4 T-Zellen sind zwar unwichtig für das Primieren von CD8 T-Zellen und für deren Differenzierung in zytotoxische Effektorzellen, werden jedoch unbedingt für eine sekundäre protektive CTL-Antwort und für die Entwicklung eines funktionellen CD8 T-Zell-Gedächtnisses benötigt [142, 271, 291]. Janssen hat herausgefunden, dass diese CD4 T-Zell-Hilfe für CD8 T-Zellen schon während des Primens festgelegt wird, da CD8 T-Zellen, die in CD4-depletierten Mäusen aktiviert wurden, nicht expandierten und sich sogar nach zweiter Stimulation dezimierten [142]. Theoretisch kann es sein, dass nur durch eine ausreichend vorhandene Menge an CD4 T-Zellen am Beginn der Infektion eine unterstützende Wirkung für die sekundäre CD8 T-Zell-Effektorfunktion „programmiert“ wird. Außerdem wurde schon nachgewiesen, dass die Etablierung einer ausreichenden Menge an CD4 oder sogar CD8 T-Zellen und damit die Stärke einer Immunantwort abhängig von der Menge des Antigens ist [211, 12, 141,

259]. Auch lösen zum Beispiel große Peptidmengen in einer hohen Dichte auf der Oberfläche von APC T_H1-Zellreaktionen aus [141]. Die Immunreaktion gegen *Listeria* wird hauptsächlich von CTL und T_H1-Tellen durchgeführt [224].

Erste Hinweise zu dieser Theorie könnten weitere Experimente mit den OVA-exprimierenden Stämmen aus dieser Arbeit liefern, wenn festgestellt würde, dass nur eine protektive T-Zell-Antwort nach Freisetzung exportierter Antigene induziert wird.

6.6 Die Eignung neuer virulenzattenuierter *Listerien* als Impfstoffträger

Potentielle bakterielle Impfstoffträger müssen eine ausreichende Virulenzattenuation aufweisen, um für eine Anwendung am Menschen zugelassen zu werden. Die Virulenzattenuation gewährleistet, dass bakterielle Stämme verwendet werden, die den Wirt zwar infizieren und das Vakzin in geeignete Wirtszellen einschleusen können, aber gleichzeitig keine krankmachenden Eigenschaften mehr besitzen. Vielmehr sind ihre virulenten Eigenschaften, die den Wirtsorganismus schädigen würden, attenuiert. Aber zusätzlich müssen diese virulenzattenuierten Trägerbakterien noch ausreichend immunogen sein, damit auch gegen diese und nicht nur gegen das zu übertragende Vakzin eine Immunantwort ausgelöst wird. Der einzige bis jetzt zugelassene *Lm* Stamm ist der Stamm $\Delta 2$, der das Lecithinaseoperon des Virulenzgenclusters (*actA*, *plcB*, *mpl*) [239] nicht mehr besitzt. Nach oraler Gabe zeigten menschliche Probanden keinerlei klinische Symptome, obwohl eindeutig auch eine humorale, zelluläre und mukosale Immunität ausgelöst wurde [6]. Diesem Stamm war es außerdem möglich effizient eine plasmidkodierte DNA für mykobakterielle Antigene in die Maus zu transportieren, so dass erfolgreich die Induktion einer protektiven zellulären Immunität gerichtet gegen *Mycobacterium tuberculosis* ausgelöst wurde [206]. Des Weiteren wurde mit den in dieser Arbeit durchgeführten Studien mit der *Lm* $\Delta trpS$ *hlyW491A* Mutante festgestellt, dass durch eine Abschwächung der listeriellen zytotoxischen Effekte der Transfer der OVA-DNA mit nachfolgender kleiner aber signifikanter Etablierung einer OVA-Präsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle möglich war. Demnach stellt die Deletion von Virulenzgenen, die an den listeriellen Effekten auf den Wirt beteiligt sind, eine Möglichkeit zur Konstruktion von effizienten attenuierten Trägerstämmen, vor allem für das „DNA-Delivery“, dar.

Deshalb wurden in dieser Arbeit die Gene *inIA*, *inIB* und *actA* in der *trpS*-Mutante deletiert, da diese an der Virulenz von *Lm* beteiligt sind. Wie schon beschrieben kodieren die Gene *inIA* und *inIB* die Oberflächenproteine Internalin A (InIA) und Internalin B (InIB), welche die Internalisierung in nicht-phagozytische Zellen vermitteln [7, 302]. ActA, was ebenfalls an die bakterielle Oberfläche exponiert wird, verhilft ebenfalls im Vermitteln der Invasion in nicht-phagozytische Zellen [290]. Die Hauptaufgabe dieses Oberflächenproteins besteht aber darin, intrazelluläres Aktin zu rekrutieren, um intra- und interzelluläre Motilität zu generieren, sobald sich *Listerien* im Zytosol der Wirtszelle befinden [58]. Aus anderen Studien ist bekannt, dass *Lm* Stämme, die in diesen Genen *inIA*, *inIB* und *actA* mutiert wurden, eine Virulenzattenuation *in vivo* aufzeigten, wobei eine *actA*-Deletion zu einer höheren Virulenzattenuation und einer schnelleren Elimination in der BALB/c Maus führte als die Doppelmutante InIAB [7]. Des Weiteren wurde durch eine Deletion des *inIB*-Genes in Studien gezeigt, dass die Leber in infizierten Mäusen weniger geschädigt war. Diese Mutante wurde auch schon erfolgreich in Vakzinestudien eingesetzt [33]. Diese Tatsachen geben

wiederum Hinweise darauf, dass die Deletion von Virulenzgenen geeignet ist, um listerielle Impfstoffträger herzustellen.

Die Deletion der einzelnen Gene *actA*, *inIA* und *inIB* wurden in die vorhandenen *Lm* Stämmen $\Delta(trpS, actA)/pflotrps$, $\Delta(trpS inIB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS aroA aroB)/pflotrps$ erfolgreich durch homologe Rekombination eingeführt, so dass folgende Deletionsstämme $\Delta(trpS inIB)/pflotrps$, $\Delta(trpS inIAB)/pflotrps$, $\Delta(trpS actA inIB)/pflotrps$, $\Delta(trpS aroA aroB inIB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS aroA aroB inIB actA)/pflotrps$ erhalten wurden. Die Überprüfung der Deletionsmutanten durch Sequenzierungen und Western Blots ergab einwandfreie Mutanten. Der Ausgangsstamm *Lm* $\Delta trpS/pflotrps$ ist allen Mutanten gemeinsam. *Lm* $\Delta trpS/pflotrps$ wurde als Ausgangsstamm gewählt, da er Bestandteil des „balanced-lethal“ Plasmid-Systems ist, welches zu 100 % *in vivo* stabil ist. Dieses *Listeria* „balanced-lethal“ Plasmid-System wurde so konstruiert, das das essentielle Gen *trpS* aus dem Chromosom entfernt und gleichzeitig auf einem Tc-haltigen Plasmid in trans komplementiert wurde. Ebenso wird durch Vorhandensein des essentiellen *trpS* Gens auf dem Plasmid (*pflotrps*) gewährleistet, das dieses Plasmid stabil an seinem Träger gebunden bleibt und das der Träger bei Verlust des Plasmides nicht mehr im Wirt überlebt [233, 235].

Um nachzuweisen, ob die jeweilige Deletionen der Virulenzgene eine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten hat, wurden Wachstumskurven mit diesen im Vergleich zu ihren isogenen WT Stämmen erstellt. Es zeigten alle Mutanten ein ähnliches Wachstumsverhalten bei Kultivierung im Vollmedium BHI, wie ihre jeweiligen isogenen WT Stämme. Demnach beeinträchtigte die Deletion der Virulenzgene *actA*, *inA* und *inIB* nicht das extrazelluläre Verhalten. Das intrazelluläre Verhalten wurde dagegen beeinflusst. Es wurde eine Virulenzattenuation der Stämme $\Delta(trpS inIAB)/pflotrps$, $\Delta(trpS aroA aroB inIB)/pflotrps$ und $\Delta(trpS aroA aroB inIB actA)/pflotrps$ nach *i. v.* Infektion in C57BL/6 Mäuse nachgewiesen. Erstaunlicherweise erwies sich die $\Delta(trpS inIB)/pflotrps$ nach *i. v.* Infektion als nicht virulenzattenuiert. Die bakterielle Beladung der Leber und Milz der infizierten Mäuse entsprach derjenigen, welche in den Kontrollmäusen *Lm* $\Delta trpS/pflotrps$ gefunden wurde. Normalerweise dürften keine *inIB*-Mutanten in den Lebern mehr zu finden sein, da InIB die Adhärenz und Invasion in Hepatozyten vermittelt [71]. Da die Lebern aber sehr blutreich waren, kann davon ausgegangen werden, dass es zu einer regelrechten Überschwemmung der Leberzellen mit infizierten Makrophagen kam, welche ihrerseits auch mit ausplattiert wurden. *Lm* kann mit Hilfe des InIAs an Makrophagen binden, so dass diese *Lm* internalisieren [263]. Deshalb reichte die Deletion des *inIA*-Genes in dieser Mutante schon aus, dass eine geringere bakterielle Ladung in Lebern der infizierten Mäuse gefunden wurde. Demnach konnten die InIA/B-defizienten Bakterien auch nicht mehr in Makrophagen eindringen. Oder der *inIB*-Mutante war es auch möglich *inIB*-unabhängig in Hepatozyten einzudringen, da andere Studien aufzeigten, das ActA oder auch PlcB die Internalisierung in Wirtszellen vermitteln konnten [7, 290]. Wie erwartet, führte die zusätzliche Deletion der Gene *actA* und *inIB* zu einer weiteren Virulenzattenuation des Ausgangsstammes *Lm* $\Delta trpS aroA aroB$ [289]. Dabei machte es auch keinen Unterschied, ob erst eins dieser beiden Gene fehlte oder beide zusammen fehlten. Durch die Deletion des *inIB* konnten diese *aroA/B*-Stämme nicht mehr InI-B abhängig invadieren und auch die InIA-abhängige Invasion sollte bei Deletion des InIB gestört sein, da InIA die Hilfe der anderen Internaline braucht [19]. Falls diese Mutanten doch in nicht-phagozytischen Zellen eindringen konnten, verblieben sie in diesen, da sie aufgrund der *actA*-Deletion nicht mehr mobil waren

Ob diese zusätzliche Virulenzattenuation sich negativ auf die Eignung als Impfstoffträger auswirkt, ist abzuwarten.

6.6.1 Die *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ -Mutante als Impfstoffträger

Anschließend wurde nur noch die *inIAB*-Mutante für die Eignung als Impfstoffträger näher charakterisiert. Es wurde nachgewiesen, dass die Deletion der großen Internaline Auswirkung auf die Effizienz des *Lm* $\Delta trpS$ Stammes als Impfstoffträger hatte.

Durch die Deletion der Internaline InIA und InIB konnte der Stamm *Lm* $\Delta trpS$ die EGFP-kodierende Plasmid-DNA effizienter in Makrophagen übertragen. Anscheinend ermöglichte die Deletion der Internaline die Abschwächung der listeriellen zytotoxischen Eigenschaften auf Makrophagen, so dass diese infizierten Makrophagen länger lebensfähig waren. Studien belegten das InIB den Transkriptionsfaktor NF- κ B in Makrophagen aktiviert [199]. NF- κ B spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung einer Anzahl von Genen, die das Immunsystem steuern, z. B. Zelltod, Zellwachstum und Gewebsdifferenzierung. Ebenso wurde nachgewiesen, dass aktiviertes NF- κ B proinflammatorische Reaktionen gegen *Lm* injiziert, was schließlich zum Zelltod der infizierten Zelle führt [123].

Auch die Ausstattung mit dem Autolysissystem P_{actA} -*ply118* ermöglichte eine zusätzliche Steigerung der Baktofektionsrate und Vitalität der infizierten Wirtszellen. Die unterstützende Wirkung der Autolysis auf die Baktofektion konnte auch schon mit dem Ausgangsstamm *Lm* $\Delta trpS$ gezeigt werden [235].

Da sich der neue Stamm *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ als ein sehr viel versprechender Vektor zur Übertragung der Plasmid-DNA in *in vitro* Experimenten herausgestellt hatte, wurde daraufhin seine Effizienz für die Übertragung des heterologen Antigens Ovalbumin in APC mit nachfolgender Antigenpräsentation *in vivo* untersucht. Dafür wurden wieder adoptive Transferexperimente durchgeführt. Der adoptive Transfer von Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen vor der eigentlichen Immunisierung mit dem Antigen erlaubt eine sehr sensitive quantitative *in vivo* Analyse von frühen Antigenpräsentationen [259].

Die jeweiligen OVA-Expressionsplasmide für das „Protein-“, „DNA-“ oder „RNA-Delivery“ wurden in den neuen Stamm erfolgreich transformiert. Die resultierenden Stämme *Lm* $\Delta(trpS inIAB)/pSP118$, *Lm* $\Delta(trpS inIAB)/pSP118-PS_{actA}OVA$, *Lm* $\Delta(trpS inIAB)/pSP118-P_{CMV}OVA$ und *Lm* $\Delta(trpS inIAB)/pCSA1+pCSB-OVA$ zeigten keinen Unterschied in ihrem extrazellulärem Wachstumsverhalten im Vergleich zu den WT Stämmen. Demnach beeinflussen die OVA-Expressionsplasmide das extrazelluläre Verhalten der Trägerstämme *Lm* $\Delta(trpS inIA inIB)$ nicht.

Eine klonale Expansion an transferierten OVA-spezifischen CD8 T-Zellen wurde nur in den Mäusen nachgewiesen, welche mit autolysierenden *Lm* $\Delta(trpS inIAB)$ Stämmen infiziert wurden, die OVA als Protein exportierten oder als mRNA übertrugen. Der DNA-übertragende Stamm zeigte dagegen keine quantitativen Ergebnisse. Die „Protein-Delivery“-Strategie stellt sich wieder als die effizienteste zur Übertragung von OVA heraus, gefolgt vom „RNA-Delivery“ in vergleichbar niedrigeren Werten. Ferner wurde festgestellt, dass die *in vivo* Ergebnisse vergleichbar den Ergebnissen mit den isogenen Trägerstämmen *Lm* $\Delta trpS$ waren. Demnach hatte die Deletion der großen Internaline InIA und InIB und die damit zusammenhängende Virulenzattenuation des

Stammes *Lm* $\Delta(trpS\ inlAB)$ keinen Einfluss auf Effizienz der Übertragung des hier verwendeten heterologen Antigens Ovalbumin.

6.7 Die Rolle des Holins und der Kombination aus Holin und Phagenlysin für die intrazelluläre Freisetzung der Plasmid-DNA

Ein letztes Ziel dieser Arbeit war die Freisetzung der Plasmid-DNA durch die intrazelluläre Autolysis der *Lm* Trägerbakterien zu optimieren. Das bisher verwendete Autolysissystem, das von G. Dietrich entwickelt wurde, erlaubt die Freisetzung und Expression eines eukarotischen Expressionsplasmides ins Zytosol der Wirtszellen durch die hydrolytischen Funktion der Endopeptidase des *Lm*-spezifischen Phagen A118 [67]. Für die Expression dieses genannten Phagenlysins Ply118 wurde das Gen des Phagenlysins 118 unter die Kontrolle des *actA*-Promotors (P_{actA} -*ply118*) gestellt, der PrfA-abhängig vorwiegend im Zytosol von eukarotischen Zellen aktiv wird. Dieses Autolysissystem wurde von S. Pilgrim weiter optimiert, indem es in das „balanced-lethal“ Plasmid-System übertragen wurde [233, 235]. Pilgrim und Kollegen konnten nachweisen, dass das optimierte Autolysissystem nun effizienter nicht-phagozytische wie auch phagozytische Zelllinien baktifiziert. Des Weiteren schien die Baktifizierungseffizienz von den Zelltypen, die infiziert wurden, abhängig zu sein [235]. Dies wurde auch in anderen Studien beobachtet [110, 124, 235]. Ebenso unterstützt dieses optimierte System *in vitro* neben der erhöhten Freisetzung von Transferplasmiden für DNA [235] auch die Freisetzung der mRNA [266] in fast allen Wirtszellen und *in vivo* die Freisetzung des Modellproteins Ovalbumins. Außerdem zeigte eine orale [235, 266] oder auch intravenöse Applikation dieser autolysierender Stämme eine geringere Anzahl an lebenden Bakterien im Vergleich zu nicht-autolysierenden Stämmen in den Organen Leber und Milz. Aber gleichzeitig konnte bei Applikation einer viermal höheren Dosis dieses Stammes als der nicht-autolysierende WT Stamm ein Wachstum in den infizierten Tieren nachgewiesen werden. Die Zunahme an intrazellulären Phagenlysin-exprimierenden Listerien wurde auch schon *in vitro* in verschiedenen Zelllinien beobachtet.

Diese teilweise oder nur stark verzögerte Lysis intrazellulärer Bakterien wirkt sich nachteilig für den Einsatz dieser autolysierenden Listerien als Impfstoffträger aus. Deshalb wurde ein alternatives Autolysissystem auf der Basis attenuierter Listerien entwickelt. Dieses Autolysissystem verwendet das zweite Protein des Phagen A118, das auch im Infektionszyklus des Phagen zur Lysis des Bakteriums beiträgt. Das Holin 118 (Hol118) stellt ein Membranprotein dar, welches Poren in der bakteriellen Zellwand bildet [305]. Zusätzlich kontrolliert das Holin den Erfolg des Lysins, da das Holin die Länge des Infektionszyklus bestimmt. Dies kann es bewerkstelligen, da ein „dual-start-motif“ in der kodierenden Sequenz des hol118 vorliegt [305]. Es werden zwei Translationsprodukte verschiedener Längen exprimiert. Das lange Produkt kodiert dabei das eigentliche porenformende Enzym (Holin), das kürzere den Inhibitor des Holins. Dieser Inhibitor formt mit dem Holin Heterooligomere, die solange in der Zytoplasmamembran eingelagert sind, bis es zu einer Aktivierung des Holins kommt und damit zur Porenbildung. Durch diese Poren gelangt anschließend das Ply118 an sein Substrat in der Peptidoglykanschicht und lysiert durch seine L-Alanoyl-D-Glutamat-Spezifität die bakterielle Zellwand [191, 189, 305]. Das Gen des Holins und eine Genkombination des Holingens und Phagenlysins, wie es wildtypisch im Phagen A118 zu finden

ist [191, 305], wurden ebenfalls unter der Kontrolle des *actA*-Promotors kloniert. Demnach wird Holin (P_{actA} -*hol*/118) und die Kombination aus Holin und Phagenlysin (P_{actA} -*holply*118) im Zytosol der Wirtszelle exprimiert.

Listerien, welche mit solch derartigen Lysiskassetten ausgestattet waren, erreichten nur zu einem sehr geringen Prozentsatz das Zytosol der Wirtszellen und setzten daraufhin fast auch keine EGFP-kodierende Plasmid-DNA frei. Nur eine bis zwei EGFP-exprimierende, grün-leuchtende Zellen wurden im infizierten Zellrasen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Auch die Verwendung von phagozytierenden Zellen konnte die Baktofektionsrate nicht steigern. Eine extrazelluläre Lysis dieser Bakterien durch alleinige Induktion der Lysiskassette im Kulturmedium wie BHI oder RPMI konnte aber ausgeschlossen werden, da Wachstumskurven wie auch die Bestimmung der Anzahl von in Kulturmedium aufgenommenen Bakterien keinen Unterschied zu nicht-Lysiskassetten-tragenden Bakterien aufzeigte. Demnach muss der Kontakt mit der Wirtszelle den *actA*-Promotor aktiviert haben, wodurch die Bakterien extrazellulär lysierten. Ein Hinweis darauf konnte die Western Blot Analyse dieser Stämme geben. Mit Hilfe des Western Blot wurde festgestellt, dass beide Produkte des Holins (Inhibitor und Holin) schon verankert in der Zellmembran beider Stämme, welche Holin oder die Kombination aus Holin und Phagenlysin exprimierten, vorlag. Da beide Formen des Holins vorhanden waren und es damit wahrscheinlich zur Heterooligomerisierung und nicht zu einer Porenbildung kam, konnte das exprimierte Phagenlysin des Stammes, welches die Kombination aus Holin und Phagenlysin enthält, nicht nach außen transportiert werden. Deshalb wurde auch das Phagenlysin nicht im Überstand dieses Stammes detektiert. Demnach wurde der Lysiseffekt wahrscheinlich durch die unerwünschte, extrazelluläre Aktivität des *actA*-Promotors ausgelöst, der beim Zellkontakt PrfA-abhängig noch verstärkt wird und demnach zur Lyse der Bakterien führte [5, 246, 290]. Der nun vermehrte Einbau des Holins und die wahrscheinlich zusätzliche Depolarisierung der bakteriellen Zellmembran durch den Zellkontakt und Einbau könnte zur Homooligomerisierung des schon vorhandenen Holins und damit zur Lochbildung geführt haben. Zwar ist die Aktivierung von Holinen noch unbekannt, jedoch beschreiben Bläsi und Young das eine mögliche Aktivierung durch die Depolarisierung der bakteriellen Membran zustande kommen könnte [25]. Eine weitere Möglichkeit beschrieb Gründling [111]. Ein kritisch-erhöhter Level des eigentlichen porenformenden Holins könnte zur Porenbildung führen. Die vermehrte Durchlöcherung der Zellmembran führt unweigerlich zur Lyse des Bakteriums. Demnach sind diese Lysiskassetten P_{actA} -*hol*/118 und P_{actA} -*holply*118 für Baktofektionsstudien gänzlich ungeeignet, da es für eine optimale Baktofektion gilt eine frühzeitige Autolysis des Trägerstammes noch vor der Invasion und außerhalb der Zielzelle zu vermeiden.

Da sich diese beiden Kassetten P_{actA} -*hol*/118 und P_{actA} -*holply*118 aufgrund der kontakt-induzierten Lysis für Baktofektionsstudien als ungeeignet herausgestellt hatten, wurden zwei weitere Lysiskassetten unter der Kontrolle des *hpt*-Promotors kloniert. Dieser listerielle Promotor, der PrfA-abhängig extrazellulär kaum aktiviert wird [46, 147], garantiert, dass die alternativen Lysiskassetten P_{hpt} -*hol*/118 und P_{hpt} -*holply*118 erst im Zytosol der Wirtszelle und nicht schon beim Kontakt mit der Zielzelle exprimiert werden. So kommt es erst im Zytosol zu einer Phagenprotein-induzierten Autolysis und der Freisetzung der Plasmid-DNA.

Listerien, welche mit solchen Lysiskassetten ausgestattet waren, baktifizierten sehr effizient unterschiedliche nicht-phagozytische wie z. B. CACO-2, COS-1, HELA oder HEPG-2, oder auch

phagozytische Zelllinien wie P388.D1 Makrophagen. In manch diesen angesprochenen Zelltypen zeigten diese Bakterien mit den Lysiskassetten $P_{hpt}-hol/118$ und $P_{hpt}-holply118$ vergleichbare oder gering niedrigere Baktofektionsraten wie nach Erhalt mit den Bakterien, welche das alte Autolysissystem $P_{actA}-ply118$ trugen. Ferner wurde beobachtet, dass das Holin oder die Kombination aus Holin und Phagenlysin unterschiedlich in den verwendeten Zelltypen wirkten. Dies konnte auch allein schon mit dem Phagenlysin beobachtet werden [235]. Außerdem fiel auf, dass das Holin bzw. die Kombination aus Holin und Phagenlysin schon früher ihre lysogene Wirkung erzielten, als das Phagenlysin allein. Diese Beobachtung ist eigentlich nicht verwunderlich, da durch Expression des porenbildenden Holins schon eine Pore in der Membran vorhanden war, durch die die Plasmid-DNA oder das Phagenlysin austreten konnte. Das im Inneren des Bakteriums exprimierte Phagenlysin der $P_{actA}-ply118$ Lysiskassette benötigt dagegen erst eine Pore, um an sein Substrat in der Zellwand des Bakteriums zu kommen. Es ist bis jetzt noch keine spontane Translokation des Phagenlysin über die Zellmembran eines gesunden Bakteriums bekannt [191]. Nach unserer und auch nach Meinung von Paterson, kann das Phagenlysin nur durch Hilfe von unbekannt Faktoren an sein Substrat in der Peptidoglykanschicht kommen [235, 280]. Solche unbekannt Faktoren können z. B. die bakteriozidischen Wirkungen von Wirtszellen sein, die das Bakterium abtöten und dadurch das Phagenlysin freisetzen. Oder Ply118 entfaltet erst seine Wirkung, wenn es in höherer Konzentration vorliegt.

Ferner wurde mit der intrazellulären Detektion der autolysierenden Listerien durch einen ActA gerichteten Antikörper oder durch Giemsa-Färbung infizierter Zellen nachgewiesen, dass diese Bakterien trotz Holin oder der Kombination aus Holin und Phagenlysin sich in den Zellen vermehrten. Sechs und 24 Stunden nach Infektion wurden genauso viele autolysierende Listerien nachgewiesen, wie Bakterien, welche nicht mit einer Lysiskassette ausgestattet waren. Demnach scheint das exprimierte Holin intrazellulär nicht richtig vom heterooligomeren Zustand in den homooligomeren Zustand überzugehen, so dass sich eine Pore in der Zellmembran bilden kann. Bestätigt wird diese Theorie dadurch, dass Listerien, welche zusätzlich neben dem Holin auch das Phagenlysin exprimierten, nicht intrazellulär verstärkt lysierten. Oder die Peptidoglykanschicht wird wieder sehr schnell repariert, da es dem Bakterium daran gelegen ist zu überleben.

Außerdem konnte durch den Nachweis der Rekrutierung des zellulären Aktins durch den ActA-gerichteten Antikörper mit nachfolgender Detektion durch TRITC-Phalloidin Antikörper festgestellt werden, dass die neuen autolysierenden Stämme zur intra- und interzellulären Motilität fähig waren. Ebenso wurde die erwartete polare Verteilung des ActA-Proteins an den Zellpolen der neuen autolysierenden Bakterien detektiert [242], im Gegensatz zu den Listerien, welche die $P_{actA}-ply118$ Lysiskassette trugen. Bei diesen wurde, wie auch schon früher festgestellt, das ActA schwächer exprimiert und unregelmäßig auf der Oberfläche lokalisiert [233]. Die richtige polare Verteilung des ActA-Proteins auf den alternativen autolysierenden *Lm* Stämmen gibt auch Hinweise auf eine intakte Zellmembran/Zellwand des intrazellulären Bakteriums wieder.

Auch *in vivo* Daten zeigten auf, dass das exprimierte Holin oder die Kombination aus Holin oder Phagenlysin sehr ineffizient die Lysis vollziehen. Dieses verwendete Lysissystem führte nicht zu einer Virulenzattenuation *in vivo*. Drei Tage nach Infektion wurden genauso viele Holin- oder HolinPhagenlysin-exprimierende Bakterien (10^5 - $10^{6.5}$) in den Milzen und Lebern infizierten C57BL/6 Mäuse gefunden, wie bei einer Infektion mit wildtypischen Bakterien. Phagenlysin-exprimierende Listerien zeigten dagegen die erwartete Virulenzattenuation.

Zusammenfassend kann man sagen, obwohl eine effiziente Baktinfektionsrate mit diesen Holin und HolinPhagenlysin-exprimierenden Listerien erreicht wurde, sind sie als Impfstoffträger ungeeignet, da sie keinerlei Virulenzattenuation aufwiesen. Einen Ausweg könnten nur virulenzattenuiertere *Lm* Stämme (z. B. $\Delta trpS aroA aroB$) als Träger dieser Lysiskassetten $P_{hpt-hol118}$ und $P_{hpt-holply118}$ geben.

Abschließend ist anzumerken, dass das bisher angewandte Autolysissystem, welches durch das Phagenlysin unter der Kontrolle des actA-Promotors verursacht wird, trotz der teilweise oder nur stark verzögerten Lysis intrazellulärer Bakterien, immer noch das effektivste System für die Baktinfektion darstellt.

Literaturverzeichnis

1. **Ahmed, R., and D. Gray.** 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**:54-60.
2. **Akira, S., and K. Takeda.** 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:499-511.
3. **Alberts, B., A. Bray, J. Johnson, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter.** 2001. Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. Wiley-VCH.
4. **Altrock, S.** 2002. Genetische Organisation und Transkription eines Virulenz-assoziierten, instabilen Chromosomenabschnitts von *Listeria ivanovii* Universität Würzburg, Würzburg.
5. **Alvarez-Dominguez, C., J. A. Vazquez-Boland, E. Carrasco-Marin, P. Lopez-Mato, and F. Leyva-Cobian.** 1997. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect. Immun.* **65**:78-88.
6. **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**:3592-3601.
7. **Appelberg, R., and I. S. Leal.** 2000. Mutants of *Listeria monocytogenes* defective in *in vitro* invasion and cell-to-cell spreading still invade and proliferate in hepatocytes of neutropenic mice. *Infect. Immun.* **68**:912-914.
8. **Asseman, C., and M. von Herrath.** 2002. About CD4pos CD25pos regulatory cells. *Autoimmun. Rev.* **1**:190-197.
9. **Autenrieth, I. B., and A. Noll.** 1998. Perspektiven für die Entwicklung neuer Impfstoffe. *Monatsschrift Kinderheilkunde* **146**:355-364.
10. **Azevedo, V., G. Levitus, A. Miyoshi, A. L. Candido, A. M. Goes, and S. C. Oliveira.** 1999. Main features of DNA-based immunization vectors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**:147-153.
11. **Bachmann, M. F., M. Barner, A. Viola, and M. Kopf.** 1999. Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *Eur. J. Immunol.* **29**:291-299.
12. **Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty.** 2002. Programmed contraction of CD8⁺ T cells after infection. *Nat. Immunol.* **3**:619-626.
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. **Beauregard, K. E., K. D. Lee, R. J. Collier, and J. A. Swanson.** 1997. pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* **186**:1159-1163.

15. **Bender, O.** 2003. Untersuchungen zur Expression des TIM-3 Moleküls auf murine T-Helfer-Zellen. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
16. **Benham, A. M., and J. J. Neefjes.** 1997. Proteasome activity limits the assembly of MHC class I molecules after IFN-gamma stimulation. *J. Immunol.* **159**:5896-5904.
17. **Bennett, S. R. M., F. R. Carbone, T. Toy, J. F. A. P. Miller, and W. R. Heath.** 1998. B cells directly tolerize CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **188**:1977-1983.
18. **Berg, R. E., E. Crossley, S. Murray, and J. Forman.** 2005. Relative contributions of NK and CD8 T cells to IFN- γ mediated innate immune protection against *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **175**:1751-1757.
19. **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. *Molecular Microbiology* **43**:557-570.
20. **Bevan, M. J.** 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* **143**:1283-1288.
21. **Beverley, P. C., and M. K. Maini.** 2000. Differences in the regulation of CD4 and CD8 T-cell clones during immune responses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**:401-406.
22. **Beverley, P. C. L.** 2002. Immunology of vaccination. *Br. Med. Bull.* **62**:15-28.
23. **Bhardwaj, V., O. Kanagawa, P. E. Swanson, and E. R. Unanue.** 1998. Chronic *Listeria* infection in SCID mice: requirements for the carrier state and the dual role of T cells in transferring protection or suppression. *J. Immunol.* **160**:376-384.
24. **Bjorkman, P. J.** 1997. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* **89**:167-170.
25. **Bläsi, U., and R. Young.** 1996. Two beginnings for a single purpose: the dual-start holins in the regulation of phage lysis. *Mol. Microbiol.* **21**:675-682.
26. **Bluestone, J. A., R. Khattri, R. Sciammas, and A. I. Sperling.** 1995. TCR gamma delta cells: a specialized T-cell subset in the immune system. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **11**:307-353.
27. **Bohne, J., H. Kestler, C. Uebele, Z. Sokolovic, and W. Goebel.** 1996. Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA. *Mol. Microbiol.* **20**:1189-1198.
28. **Bohne, J., Z. Sokolovic, and W. Goebel.** 1994. Transcriptional regulation of prfA and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **11**:1141-1150.
29. **Bouwer, H. G. A., C. Alberti-Segui, M. J. Montfort, N. D. Berkowitz, and D. E. Higgins.** 2006. Directed antigen delivery as a vaccine strategy for an intracellular bacterial pathogen. *PNAS* **103**:5102-5107.
30. **Braun, L., B. Ghebrehiwet, and P. Cossart.** 2000. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InIB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *Embo. J.* **19**:1458-1466.
31. **Braun, L., F. Nato, B. Payraastre, J. C. Mazie, and P. Cossart.** 1999. The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InIB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol. Microbiol.* **34**:10-23.

32. **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**:1077-1087.
33. **Brockstedt, D. G., M. A. Giedlin, M. L. Leong, K. S. Bahjat, Y. Gao, W. Lockett, W. Liu, D. N. Cook, D. A. Portnoy, and T. W. Dubensky, Jr.** 2004. *Listeria*-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:13832-13837.
34. **Brundage, R. A., G. A. Smith, A. Camilli, J. A. Theriot, and D. A. Portnoy.** 1993. Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:11890-11894.
35. **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**:401-407.
36. **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**:323-336.
37. **Buchmeier, N. A., and R. D. Schreiber.** 1985. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:7404-7408.
38. **Burke, B., S. Sumner, N. Maitland, and C. E. Lewis.** 2002. Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets. *J. Leukoc. Biol.* **72**:417-428.
39. **Busch, D. H., and E. G. Pamer.** 1998. MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL. *J. Immunol.* **160**:4441-4448.
40. **Busch, D. H., and E. G. Pamer.** 1999. T lymphocyte dynamics during *Listeria monocytogenes* infection. *Immunol. Lett.* **65**:93-98.
41. **Cabanes, D., P. Dehoux, O. Dussurget, L. Frangeul, and P. Cossart.** 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology* **10**:238-245.
42. **Camilli, A., L. G. Tilney, and D. A. Portnoy.** 1993. Dual roles of plcA in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **8**:143-157.
43. **Cano, F., H. Plotnicky-Gilquin, T. N. Nguyen, S. Liljeqvist, P. Samuelson, J.-Y. 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**:2743-2752.
44. **Chakraborty, T., M. Leimeister-Wachter, E. Domann, M. Hartl, W. Goebel, T. Nichterlein, and S. Notermans.** 1992. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the prfA gene. *J. Bacteriol.* **174**:568-574.
45. **Chen, W., and G. Georgiou.** 2002. Cell-Surface display of heterologous proteins: From high-throughput screening to environmental applications. *Biotechnol. Bioeng.* **79**:496-503.
46. **Chico-Calero, I., M. Suarez, B. Gonzalez-Zorn, M. Scotti, J. Slaghuis, W. Goebel, T. European Listeria Genome Consortium, and J. A. Vazquez-Boland.** 2002. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *PNAS* **99**:431-436.
47. **Collins, M. D., S. Wallbanks, D. J. Lane, J. Shah, R. Nietupski, J. Smida, M. Dorsch, and E. Stackebrandt.** 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:240-246.

48. **Conlan, J. W.** 1996. Early pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection in the mouse spleen. *J. Med. Microbiol.* **44**:295-302.
49. **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**:741-744.
50. **Conlan, J. W., and R. J. North.** 1994. Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **179**:259-268.
51. **Conlan, J. W., and R. J. North.** 1992. Roles of *Listeria monocytogenes* virulence factors in survival: virulence factors distinct from listeriolysin are needed for the organism to survive an early neutrophil-mediated host defense mechanism. *Infect. Immun.* **60**:951-957.
52. **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**:5679-5687.
53. **Cossart, P.** 2000. Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell. Microbiol.* **2**:195-205.
54. **Cossart, P.** 2002. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:401-409.
55. **Cossart, P., and C. Kocks.** 1994. The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **13**:395-402.
56. **Coyle, A. J., and J. C. Gutierrez-Ramos.** 2001. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat. Immunol.* **2**:203-209.
57. **Cresswell, P., A. L. Ackerman, A. Giodini, D. R. Peaper, and P. A. Wearsch.** 2005. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol. Rev.* **207**:145-157.
58. **Darji, A., D. Bruder, S. zur Lage, B. Gerstel, T. Chakraborty, J. Wehland, and S. Weiss.** 1998. The Role of the Bacterial Membrane Protein ActA in Immunity and Protection Against *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **161**:2414-2420.
59. **Darji, A., W. Mohamed, E. Domann, and T. Chakraborty.** 2003. Induction of immune responses by attenuated isogenic mutant strains of *Listeria monocytogenes*. *Vaccine* **21 Suppl 2**:S102-109.
60. **Decatur, A. L., and D. A. Portnoy.** 2000. A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science* **290**:992-995.
61. **DeGrendele, H. C., M. Kosfischer, P. Estess, and M. H. Siegelman.** 1997. CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. *J. Immunol.* **159**:2549-2553.
62. **DeKruyff, R. H., L. V. Rizzo, and D. T. Umetsu.** 1993. Induction of immunoglobulin synthesis by CD4⁺ T cell clones. *Semin. Immunol.* **5**:421-430.
63. **Dempsey, P. W., S. E. Doyle, J. Q. He, and G. Cheng.** 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**:193-209.
64. **Dertzbaugh, M. T.** 1998. Genetically engineered vaccines: an overview. *Plasmid* **39**:100-113.

65. **Desvaux, M., E. Dumas, I. Chafsey, and M. Hebraud.** 2006. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiology Letters* **256**:1-15.
66. **Dhar, G., K. F. Faull, and O. Schneewind.** 2000. Anchor Structure of Cell Wall Surface Proteins in *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry* **39**:3725-3733.
67. **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**:181-185.
68. **Dietrich, G., and W. Goebel.** 2002. Vaccine Delivery Strategies. Horizon Scientific Press, Norfolk, England.
69. **Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque, and C. Caux.** 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* **188**:373-386.
70. **Domann, E., J. Wehland, K. Niebuhr, C. Haffner, M. Leimeister-Wachter, and T. Chakraborty.** 1993. Detection of a prfA-independent promoter responsible for listeriolysin gene expression in mutant *Listeria monocytogenes* strains lacking the PrfA regulator. *Infect. Immun.* **61**:3073-3075.
71. **Dramsi, S., I. Biswas, E. Maguin, L. Braun, P. Mastroeni, and P. Cossart.** 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Molecular Microbiology* **16**(2):251-261.
72. **Dramsi, S., and P. Cossart.** 2003. Listeriolysin O-mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the Human hep-2 epithelial cell line. *Infect. Immun.* **71**:3614-3618.
73. **Duschl, A.** 2005. Molekulare Mechanismen der Innate Immunity.
74. **Dussurget, O., J. Pizarro-Cerda, and P. Cossart.** 2004. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:587-610.
75. **Edelson, B. T., P. Cossart, and E. R. Unanue.** 1999. Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection. *J. Immunol.* **163**:4087-4090.
76. **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. *Molecular Microbiology* **21**:823-837.
77. **Engering, A., I. Lefkovits, and J. Pieters.** 1997. Analysis of subcellular organelles involved in major histocompatibility complex (MHC) class II-restricted antigen presentation by electrophoresis. *Electrophoresis* **18**:2523-2530.
78. **Ermolaeva, S., S. Novella, Y. Vega, M.-T. Ripio, M. Scotti, and J. A. Vazquez-Boland.** 2004. Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. *Molecular Microbiology* **52**:601-611.
79. **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**:179-187.
80. **Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder, and P. M. Guyre.** 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* **157**:541-548.

81. **Farber, J. M., and P. I. Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**:476-511.
82. **Flutter, B., and B. Gao.** 2004. MHC class I antigen presentation-recently trimmed and well presented. *Cell. Mol. Immunol.* **1**:22-30.
83. **Foundation, F. S.** Wikipedia.
84. **Freitag, N. E., L. Rong, and D. A. Portnoy.** 1993. Regulation of the *prfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **61**:2537-2544.
85. **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**:2822-2829.
86. **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**:1299-1308.
87. **Gaillard, J. L., F. Jaubert, and P. Berche.** 1996. The *inlAB* locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes in vivo. *J. Exp. Med.* **183**:359-369.
88. **Galen, J. E., and M. M. Levine.** 2001. Can a "flawless" live vector vaccine strain be engineered? *Trends in Microbiology* **9**:372-376.
89. **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**:506-516.
90. **Garandeau, C., H. Reglier-Poupet, I. Dubail, J.-L. Beretti, P. Berche, and A. Charbit.** 2002. The Sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* Is Involved in Processing of Internalin and in Virulence. *Infect. Immun.* **70**:1382-1390.
91. **Garmory, H. S., K. A. Brown, and R. W. Titball.** 2003. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genet. Vaccines Ther.* **1**:2.
92. **Gasanov, U., D. Hughes, and P. M. Hansbro.** 2004. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews* **29**:851-875.
93. **Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A. Bairoch.** 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; p. 571-607 *In* J. M. W. (ed) (ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press.
94. **Gentschev, I., G. Dietrich, S. Spreng, S. Pilgrim, J. Stritzker, A. Kolb-Maurer, and W. Goebel.** 2001. Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* **291**:577-582.
95. **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**:239-247.
96. **Germanier, R., and E. Fuer.** 1975. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* **131**:553-558.
97. **Gerwien, J.** 2001. Die von bakteriellen Enterotoxinen induzierten Signale in humanen CD4+ T-Zellen. Freie Universität Berlin, Berlin.
98. **Gett, A. V., and P. D. Hodgkin.** 2000. A cellular calculus for signal integration by T cells. *Nat. Immunol.* **1**:239-244.

99. **Gilboa, E., and J. Vieweg.** 2004. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol. Rev.* **199**:251-263.
100. **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. G.-D. 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**:849-852.
101. **Glomski, I. J., M. M. Gedde, A. W. Tsang, J. A. Swanson, and D. A. Portnoy.** 2002. The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J. Cell. Biol.* **156**:1029-1038.
102. **Goebel, W., S. Müller-Altrock, and J. Kreft.** 2006. Regulation of virulence genes in pathogenic *Listeria* spp. In V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), *Gram-positive Pathogens*. ASM press, Washington, D. C.
103. **Goldberg AL, C. P., Saric T, Rock KL.** 2002. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol. Immunol.* **39**:147-164.
104. **Goldfine, H., and S. J. Wadsworth.** 2002. Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect.* **4**:1335-1343.
105. **Goossens, P. L., C. Montixi, M. F. Saron, M. Rodriguez, F. Zavala, and G. Milon.** 1995. *Listeria monocytogenes*: a live vector able to deliver heterologous protein within the cytosol and to drive a CD8 dependent T cell response. *Biologicals* **23**:135-143.
106. **Gray, M. L., and A. M. Killinger.** 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* **30**:304-328.
107. **Gregory, S. H., and C. C. Liu.** 2000. CD8+ T-cell-mediated response to *Listeria monocytogenes* taken up in the liver and replicating within hepatocytes. *Immunol. Rev.* **174**:112-122.
108. **Gregory, S. H., A. J. Sagnimeni, and E. J. Wing.** 1997. Internalin B promotes the replication of *Listeria monocytogenes* in mouse hepatocytes. *Infect. Immun.* **65**:5137-5141.
109. **Greiffenberg, L., W. Goebel, K. S. Kim, I. Weiglein, A. Bubert, F. Engelbrecht, M. Stins, and M. Kuhn.** 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect. Immun.* **66**:5260-5267.
110. **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**:862-866.
111. **Gründling, A., M. D. Manson, and R. Young.** 2001. Holins kill without warning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:9348-9352.
112. **Grünebach, F., M. R. Müller, and P. Brossart.** 2005. New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **54**:517-525.
113. **Gurunathan, S., D. M. Klinman, and R. A. Seder.** 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:927-974.

114. **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**:119-126.
115. **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**:3665-3673.
116. **Guzman, C. A., D. Saverino, E. Medina, D. Fenoglio, B. Gerstel, A. Merlo, G. Li Pira, F. Buffa, T. Chakraborty, and F. Manca.** 1998. Attenuated *Listeria monocytogenes* carrier strains can deliver an HIV-1 gp120 T helper epitope to MHC class II-restricted human CD4⁺ T cells. *European Journal of Immunology* **28**:1807-1814.
117. **Hacker, J., and J. Heesemann.** 2000. *Molekulare Infektionsbiologie*. Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg; Berlin.
118. **Hahn, F.** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, vol. 4. Springer Verlag.
119. **Hamon, M. I., H. I. n. Bierne, and P. Cossart.** 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Rev. Micro.* **4**:423-434.
120. **Hansson, M., P. Samuelson, E. Gunneriusson, and S. Stahl.** 2001. Surface display on gram positive bacteria. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **4**:171-184.
121. **Harty, J. T., and M. J. Bevan.** 1995. Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN gamma. *Immunity* **3**:109-117.
122. **Harty, J. T., and E. G. Pamer.** 1995. CD8 T lymphocytes specific for the secreted p60 antigen protect against *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **154**:4642-4650.
123. **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**:2740-2747.
124. **Hense, M., E. Domann, S. Krusch, P. Wachholz, K. E. J. Dittmar, M. Rohde, J. Wehland, T. Chakraborty, and S. Weiss.** 2001. Eukaryotic expression plasmid transfer from the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* to host cells. *Cellular Microbiology* **3**:599-609.
125. **Hess, J., G. Dietrich, I. Gentschev, D. Miko, W. Goebel, and S. H. Kaufmann.** 1997. Protection against murine listeriosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the naturally somatic antigen superoxide dismutase. *Infect. Immun.* **65**:1286-1292.
126. **Hess, J., I. Gentschev, D. Miko, M. Welzel, C. Ladel, W. Goebel, and S. H. E. Kaufmann.** 1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *PNAS* **93**:1458-1463.
127. **Heymer, B., C. H. Wirsing von Konig, H. Finger, H. Hof, and P. Emmerling.** 1988. Histomorphology of experimental listeriosis. *Infection* **16 Suppl 2**:S106-111.
128. **Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler.** 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* **5**:971-974.
129. **Hof, H. T., T. Nichterlein, and M. Kretschmar.** 1997. Management of listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:345-357.
130. **Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone.** 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**:17-27.

131. **Hoiseth, S. K., and B. A. Stocker.** 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**:238-239.
132. **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**:1742-1745.
133. **Huntington, J. A., and P. E. Stein.** 2001. Structure and properties of ovalbumin. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **756**:189-198.
134. **Iezzi, G., D. Scheidegger, and A. Lanzavecchia.** 2001. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* **193**:987-993.
135. **Igietseme, J. U., F. O. Eko, Q. He, and C. M. Black.** 2004. Antibody regulation of T cell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev Vaccines* **3**:23-34.
136. **Ikonomidis, G., Y. Paterson, F. J. Kos, and D. A. Portnoy.** 1994. Delivery of a viral antigen to the class I processing and presentation pathway by *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* **180**:2209-2218.
137. **Inaba, K., J. P. Metlay, M. T. Crowley, M. Witmer-Pack, and R. M. Steinman.** 1990. Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int. Rev. Immunol.* **6**:197-206.
138. **Ireton, K., B. Payraastre, H. Chap, W. Ogawa, H. Sakaue, M. Kasuga, and P. Cossart.** 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* **274**:780-782.
139. **Ireton, K., B. Payraastre, and P. Cossart.** 1999. The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **274**:17025-17032.
140. **Jacobs, T., A. Darjii, S. Weiss, and e. al.** 1999. Listeriolysin, the thiol-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*. In P. Alouf (ed.), *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. Academic Press, New York.
141. **Janeway, P., Travers, M., Walport, and M. Shlomchick.** 2002. *Immunologie*, vol. 5. Spektrum, Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg; Berlin.
142. **Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath, and S. P. Schoenberger.** 2003. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* **421**:852-856.
143. **Jenner.** 1798. An Inquiry into the causes and effects of the varolae vaccinae. A disease discovered in some of the western counties of England; Particularly Gloucestershire, and known by the name of the cox pox.
144. **Jiang, W., W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig.** 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**:151-155.
145. **Johnson, A. G.** *Immunologie auf 70 Seiten*. Thieme Verlag, Stuttgart.
146. **Jondal, M., R. Schirmbeck, and J. Reimann.** 1996. MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* **5**:295-302.
147. **Joseph, B., K. Przybilla, C. Stuhler, K. Schauer, J. Slaghuis, T. M. Fuchs, and W. Goebel.** 2006. Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. *J. Bacteriol.* **188**:556-568.
148. **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**:211-220.

149. **Junttila, J. R., S. I. Niemela, and J. Hirn.** 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.* **65**:321-327.
150. **Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel.** 1994. CD8⁺ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **24**:3068-3072.
151. **Karima, R., S. Matsumoto, H. Higashi, and K. Matsushima.** 1999. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol. Med. Today* **5**:123-132.
152. **Kaufmann, S. H.** 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:129-163.
153. **Kaufmann, S. H., and P. Andersen.** 1998. Immunity to mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine. *Chem. Immunol.* **70**:21-59.
154. **Kaufmann, S. H. E.** 1998. Immunologische Grundlagen neuer Impfstrategien. *Naturwissenschaften* **85**:62-72.
155. **Kaufmann, S. H. E., and J. Hess.** 1999. Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development. *Immunology Letters* **65**:81-84.
156. **Kayal, S., A. Lilienbaum, O. Join-Lambert, X. Li, A. Israel, and P. Berche.** 2002. Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* induces NF-kappaB signalling by activating the IkappaB kinase complex. *Mol. Microbiol.* **44**:1407-1419.
157. **Kayser, F. H., K. A. Bienz, J. Eckert, and R. M. Zinkernagel.** 2001. *Medizinische Mikrobiologie*, vol. 10. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
158. **Kedl, R. M., and M. F. Mescher.** 1998. Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8⁺ T cell response. *J. Immunol.* **161**:674-683.
159. **Keil GM, Fibi MR, and K. UH.** 1985 Characterization of the major immediate-early polypeptides encoded by murine cytomegalovirus. *Journal of Virology* **54(2)**:422-428.
160. **Keil, G. M., A. Ebeling-Keil, and U. H. Koszinowski.** 1987. Immediate-early genes of murine cytomegalovirus: location, transcripts, and translation products. *Journal of Virology* **61(2)**:526-533.
161. **Kleinig, H., and P. Sitte.** 1999. *Zellbiologie: ein Lehrbuch*, vol. 4. Auflage. G. Fischer, Stuttgart; Lübeck; Jena; Ulm.
162. **Kohda, C., I. Kawamura, H. Baba, T. Nomura, Y. Ito, T. Kimoto, I. Watanabe, and M. Mitsuyama.** 2002. Dissociated linkage of cytokine-inducing activity and cytotoxicity to different domains of listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **70**:1334-1341.
163. **Kolb-Maurer, A., U. Kammerer, M. Maurer, I. Gentschev, E. B. Brocker, P. Rieckmann, and E. Kampgen.** 2003. Production of IL-12 and IL-18 in human dendritic cells upon infection by *Listeria monocytogenes*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35**:255-262.
164. **Koniaras, C., W. R. Heath, and A. M. Lew.** 1998. T cell unresponsiveness in vitro can be due to activation in vivo. *Int. Immunol.* **10**:365-369.
165. **Kotton, C. N., and E. L. Hohmann.** 2004. Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. *Infect. Immun.* **72**:5535-5547.

166. **Kovacsovics-Bankowski, M., K. Clark, B. Benacerraf, and K. L. Rock.** 1993. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:4942-4946.
167. **Kowalczyk, D. W., and H. C. Ertl.** 1999. Immune responses to DNA vaccines. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**:751-770.
168. **Kreft, J., and J. A. Vazquez-Boland.** 2001. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:145-157.
169. **Krull, M., R. Nost, S. Hippenstiel, E. Domann, T. Chakraborty, and N. Suttorp.** 1997. *Listeria monocytogenes* potently induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* **159**:1970-1976.
170. **Krusch, S., E. Domann, M. Frings, A. Zelmer, M. Diener, T. Chakraborty, and S. Weiss.** 2002. *Listeria monocytogenes* mediated CFTR transgene transfer to mammalian cells. *The Journal of Gene Medicine* **4**:655-667.
171. **Kudela, P., S. Paukner, U. B. Mayr, D. Cholujova, Z. Schwarczova, J. Sedlak, J. Bizik, and W. Lubitz.** 2005. Bacterial ghosts as novel efficient targeting vehicles for DNA delivery to the human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunother.* **28**:136-143.
172. **Kuijpers, T. W., B. C. Hakkert, M. Hoogerwerf, J. F. Leeuwenberg, and D. Roos.** 1991. Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in neutrophil adherence to IL-1-prestimulated endothelial cells. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation. *J. Immunol.* **147**:1369-1376.
173. **Kurt-Jones, E. A., H. W. t. Virgin, and E. R. Unanue.** 1986. In vivo and in vitro expression of macrophage membrane interleukin 1 in response to soluble and particulate stimuli. *J. Immunol.* **137**:10-14.
174. **Labat-Moleur, F., A. M. Steffan, C. Brisson, H. Perron, O. Feugeas, P. Furstenberger, F. Oberling, E. Brambilla, and J. P. Behr.** 1996. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther* **3**:1010-1017.
175. **Lambert, P.-H., M. Liu, and C.-A. Siegrist.** 2005. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? *Nat Med.*
176. **Lauterbach, H.** 2004. Vergleichende Untersuchung verschiedener genetischer Impfstoffvektoren in vivo. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
177. **Lebhart, G., and R. Münz,** posting date. Mortalität, Lebenserwartung, Todesursachen. [Online.]
178. **Lechardeur, D., and G. L. Lukacs.** 2002. Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr. Gene. Ther.* **2**:183-194.
179. **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**:482-497.
180. **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**:3956-3963.
181. **Lecuit, M., H. Ohayon, L. Braun, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1997. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect. Immun.* **65**:5309-5319.
182. **Leimeister-Wachter, M., C. Haffner, E. Domann, W. Goebel, and T. Chakraborty.** 1990. Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:8336-8340.

183. **Levin, D., S. Constant, T. Pasqualini, R. Flavell, and K. Bottomly.** 1993. Role of dendritic cells in the priming of CD4⁺ T lymphocytes to peptide antigen in vivo. *J. Immunol.* **151**:6742-6750.
184. **Levine, M. M., and M. B. Sztein.** 2004. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nat. Immunol.* **5**:460-464.
185. **Li, M., G. M. Davey, R. M. Sutherland, C. Kurts, A. M. Lew, C. Hirst, F. R. Carbone, and W. R. Heath.** 2001. Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J. Immunol.* **166**:6099-6103.
186. **Li, Z., X. Zhao, D. E. Higgins, and F. R. Frankel.** 2005. Conditional lethality yields a new vaccine strain of *Listeria monocytogenes* for the induction of cell-mediated immunity. *Infect. Immun.* **73**:5065-5073.
187. **Loessner, M. J.** 2005. Bacteriophage endolysins -- current state of research and applications. *Current Opinion in Microbiology* **8**:480-487.
188. **Loessner, M. J., and M. Busse.** 1990. Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1912-1918.
189. **Loessner, M. J., R. B. Inman, P. Lauer, and R. Calendar.** 2000. Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes* spp: implications for phage evolution. *Molecular Microbiology* **35**:324-340.
190. **Loessner, M. J., K. Kramer, F. Ebel, and S. Scherer.** 2002. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.* **44**:335-349.
191. **Loessner, M. J., G. Wendlinger, and S. Scherer.** 1995. Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol. Microbiol.* **16**:1231-1241.
192. **Low, J. C., and W. Donachie.** 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal* **153**:9-29.
193. **Lundqvist, A., G. Noffz, M. Pavlenko, S. Saeboe-Larssen, 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**:445-454.
194. **Mackaness, G. B.** 1962. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* **116**:381-406.
195. **Mackay, C. R., D. P. Andrew, M. Briskin, D. J. Ringler, and E. C. Butcher.** 1996. Phenotype, and migration properties of three major subsets of tissue homing T cells in sheep. *Eur. J. Immunol.* **26**:2433-2439.
196. **MacLennan, I. C., C. Garcia de Vinuesa, and M. Casamayor-Palleja.** 2000. B-cell memory and the persistence of antibody responses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**:345-350.
197. **Maini, M. K., N. Gudgeon, L. R. Wedderburn, A. B. Rickinson, and P. C. Beverley.** 2000. Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype. *J. Immunol.* **165**:5729-5737.
198. **Mandel, T. E., and C. Cheers.** 1980. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. *Infect. Immun.* **30**:851-861.
199. **Mansell, A., L. Braun, P. Cossart, and L. A. J. O'Neill.** 2000. A novel function of InlB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF- κ B in J774 macrophages. *Cellular Microbiology* **2**:127-136.

200. **Marco, A. J., J. Altimira, N. Prats, S. Lopez, L. Dominguez, M. Domingo, and V. Briones.** 1997. Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. *Microb. Pathog.* **23**:255-263.
201. **Matzinger, P.** 1998. An innate sense of danger. *Semin. Immunol.* **10**:399-415.
202. **Medina, E., and C. A. Guzmán.** 2000. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* **19**:1573-1580.
203. **Mengaud, J., S. Dramsi, E. Guoin, J. A. Vazquez-Boland, G. Milon, and P. Cossart.** 1991. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol. Microbiol.* **5**:2273-2283.
204. **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**:923-932.
205. **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**:6833-6839.
206. **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**:2014-2021.
207. **Milenbachs, A. A., D. P. Brown, M. Moors, and P. Youngman.** 1997. Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **23**:1075-1085.
208. **Momburg, F., J. J. Neefjes, and G. J. Hammerling.** 1994. Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters. *Curr. Opin. Immunol.* **6**:32-37.
209. **Mommaas, A. M., A. A. Mulder, R. Jordens, C. Out, M. C. Tan, P. Cresswell, P. M. Kluin, and F. Koning.** 1999. Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur. J. Immunol.* **29**:571-580.
210. **Moncada, S., and R. M. Palmer.** 1991. Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin. Perinatol.* **15**:16-19.
211. **Montoya, M., and M. Del Val.** 1999. Intracellular rate-limiting steps in MHC class I antigen processing. *J. Immunol.* **163**:1914-1922.
212. **Moors, M. A., B. Levitt, P. Youngman, and D. A. Portnoy.** 1999. Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **67**:131-139.
213. **Morello, C. S., M. Ye, and D. H. Spector.** 2002. Development of a vaccine against murine cytomegalovirus (MCMV), Consisting of Plasmid DNA and formalin-inactivated MCMV, that provides long-term, complete protection against viral replication. *J. Virol.* **76**:4822-4835.
214. **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**:403-411.
215. **Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman.** 1986. Two types of murine helper T cell clone: Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**:2348-2357.

216. **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**:749-760.
217. **Murali-Krishna, K., L. L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman, and R. Ahmed.** 1999. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* **286**:1377-1381.
218. **Murphy, K. M., A. B. Heimberger, and D. Y. Loh.** 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* **250**:1720-1723.
219. **Murray, E. G. D., R. A. Webb, and M. B. R. Swann.** 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* **29**:407-439.
220. **Neutra, M. R., and P. A. Kozlowski.** 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:148-158.
221. **Nicholson, I. C.** 2002. CD62L (L-selectin). *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **16**:144-146.
222. **Ochsenbein, A. F., T. Fehr, C. Lutz, M. Suter, F. Brombacher, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel.** 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* **286**:2156-2159.
223. **Ohteki, T., T. Fukao, K. Suzue, C. Maki, M. Ito, M. Nakamura, and S. Koyasu.** 1999. Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **189**:1981-1986.
224. **Pamer, E. G.** 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:812-823.
225. **Pamer, E. G., J. T. Harty, and M. J. Bevan.** 1991. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **353**:852-855.
226. **Pan, Z. K., G. Ikonomidis, A. Lazenby, D. Pardoll, and Y. Paterson.** 1995. A recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine expressing a model tumour antigen protects mice against lethal tumour cell challenge and causes regression of established tumours. *Nat. Med.* **1**:471-477.
227. **Pape, K. A., E. R. Kearney, A. Khoruts, A. Mondino, R. Merica, Z. M. Chen, E. Ingulli, J. White, J. G. Johnson, and M. K. Jenkins.** 1997. Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation *in vivo*. *Immunol. Rev.* **156**:67-78.
228. **Park, S. F., and R. G. Kroll.** 1993. Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **8**:653-661.
229. **Paterson, Y.** 2003. Rational approaches to immune regulation. *Immunol. Res.* **27**:451-462.
230. **Paukner, S., T. Stiedl, P. Kudela, J. Bizik, F. Al Laham, and W. Lubitz.** 2006. Bacterial ghosts as a novel advanced targeting system for drug and DNA delivery. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* **3**:11-22.
231. **Peel, M., W. Donachie, and A. Shaw.** 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J. Gen. Microbiol.*:2171-2178.
232. **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**:243-253.

233. **Pilgrim, S.** 2002. Entwicklung eines „DNA Delivery“ Systems auf der Basis von Virulenz-attenuierten Listerien. Universität Würzburg, Würzburg.
234. **Pilgrim, S., A. Kolb-Maurer, I. Gentschev, W. Goebel, and M. Kuhn.** 2003. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. *Infect. Immun.* **71**:3473-3484.
235. **Pilgrim, S., J. Stritzker, C. Schoen, A. Kolb-Maurer, G. Geginat, M. J. Loessner, I. Gentschev, and W. Goebel.** 2003. Bactofection of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: improvement and mechanism of DNA delivery. *Gene. Ther.* **10**:2036-2045.
236. **Ponsaerts, P., V. F. Van Tendeloo, and Z. N. Berneman.** 2003. Cancer immunotherapy using RNA-loaded dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* **134**:378-384.
237. **Ponsaerts, P., V. F. Van Tendeloo, N. Cools, A. Van Driessche, F. Lardon, G. Nijs, M. Lenjou, G. Mertens, C. Van Broeckhoven, D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman.** 2002. mRNA-electroporated mature dendritic cells retain transgene expression, phenotypical properties and stimulatory capacity after cryopreservation. *Leukemia* **16**:1324-1330.
238. **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**:409-414.
239. **Portnoy, D. A., T. Chakraborty, W. Goebel, and P. Cossart.** 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* **60**:1263-1267.
240. **Pouton, C. W.** 1998. Nuclear import of polypeptides, polynucleotides and supramolecular complexes. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **34**:51-64.
241. **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**:331-340.
242. **Rafelski, S. M., and J. A. Theriot.** 2006. Mechanism of polarization of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA. *Molecular Microbiology* **59**:1262-1279.
243. **Rakhmievich, A. L.** 1994. Evidence for a significant role of CD4+ T cells in adoptive immunity to *Listeria monocytogenes* in the liver. *Immunology* **82**:249-254.
244. **Reinhardt, R. L., A. Khoruts, R. Merica, T. Zell, and M. K. Jenkins.** 2001. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* **410**:101-105.
245. **Reis e Sousa, C., P. D. Stahl, and J. M. Austyn.** 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* **178**:509-519.
246. **Renzone, A., P. Cossart, and S. Dramsi.** 1999. PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts. *Molecular Microbiology* **34**:552-561.
247. **Ripio, M. T., G. Dominguez-Bernal, M. Suarez, K. Brehm, P. Berche, and J. A. Vazquez-Boland.** 1996. Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. *Res. Microbiol.* **147**:371-384.
248. **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**:1163-1170.
249. **Robert-Koch-Institut,** posting date. Listeriose. [Online.]

250. **Robinson, H. L., and R. R. Amara.** 2005. T cell vaccines for microbial infections. *Nat. Med.*
251. **Rock, K. L., and L. Shen.** 2005. Cross-presentation: underlying mechanism and role in immune surveillance. *Immunological Reviews* **207**:166-183.
252. **Rock, K. L., I. A. York, and A. L. Goldberg.** 2004. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* **5**:670-677.
253. **Rocourt, J.** 1999. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic positions, taxonomy, and identification, p. 1-20. *In* E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria, listeriosis, and food safety*, vol. 2. Marcel Dekker Inc., New York, N. Y.
254. **Rogers, H. W., M. P. Callery, B. Deck, and E. R. Unanue.** 1996. *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J. Immunol.* **156**:679-684.
255. **Rogers, H. W., and E. R. Unanue.** 1993. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect. Immun.* **61**:5090-5096.
256. **Roland, K. L., S. A. Tinge, K. P. Killeen, and S. K. Kochi.** 2005. Recent advances in the development of live, attenuated bacterial vectors. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **7**:62-72.
257. **Rolland, A.** 2006. Nuclear gene delivery: the Trojan horse approach. *Expert Opinion on Drug Delivery* **3**:1-10.
258. **Rosenthal, A. S., and E. M. Shevach.** 1973. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes: requirements for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J. Exp. Med.* **138**:1194-1212.
259. **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**:4951-4960.
260. **Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia.** 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**:389-400.
261. **Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia.** 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**:708-712.
262. **Samuelson, P., E. Gunneriusson, P. A. Nygren, and S. Stahl.** 2002. Display of proteins on bacteria. *J. Biotechnol.* **96**:129-154.
263. **Sawyer, R. T., D. A. Drevets, P. A. Campbell, and T. A. Potter.** 1996. Internalin A can mediate phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by mouse macrophage cell lines. *J. Leukoc. Biol.* **60**:603-610.
264. **Schlech, W. F., 3rd, D. P. Chase, and A. Badley.** 1993. A model of food-borne *Listeria monocytogenes* infection in the Sprague-Dawley rat using gastric inoculation: development and effect of gastric acidity on infective dose. *Int. J. Food Microbiol.* **18**:15-24.
265. **Schoen, C.** 2005. Entwicklung neuartiger bakterieller Vektoren zur Übertragung von zellassoziierten Antigenen, DNA und RNA auf der Basis virulenzattenuierter *L. monocytogenes*. Universität Würzburg, Würzburg.
266. **Schoen, C., A. Kolb-Maurer, G. Geginat, D. Löffler, B. Bergmann, J. Stritzker, A. A. Szalay, S. Pilgrim, and W. Goebel.** 2005. Bacterial delivery of functional messenger RNA to mammalian cells. *Cell. Microbiol.* **7**:709-724.
267. **Schoen, C., J. Stritzker, W. Goebel, and S. Pilgrim.** 2004. Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**:319-335.

268. **Schuchat, A., B. Swaminathan, and C. V. Broome.** 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:169-183.
269. **Seki, E., H. Tsutsui, N. M. Tsuji, N. Hayashi, K. Adachi, H. Nakano, S. Futatsugi-Yumikura, O. Takeuchi, K. Hoshino, S. Akira, J. Fujimoto, and K. Nakanishi.** 2002. Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice. *J. Immunol.* **169**:3863-3868.
270. **Serbina, N., and E. G. Pamer.** 2003. Quantitative studies of CD8+ T-cell responses during microbial infection. *Curr. Opin. Immunol.* **15**:436-442.
271. **Shedlock, D. J., and H. Shen.** 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**:337-339.
272. **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**:2053-2063.
273. **Shen, H., M. Kanoh, F. Liu, S. Maruyama, and Y. Asano.** 2004. Modulation of the immune system by *Listeria monocytogenes*-mediated gene transfer into mammalian cells. *Microbiol. Immunol.* **48**:329-337.
274. **Shen, H., J. F. Miller, X. Fan, D. Kolwyck, R. Ahmed, and J. T. Harty.** 1998. Compartmentalization of bacterial antigens: differential effects on priming of CD8 T cells and protective immunity. *Cell* **92**:535-545.
275. **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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:3987-3991.
276. **Shen, L., and K. L. Rock.** 2004. Cellular protein is the source of cross-priming antigen in vivo. *PNAS* **101**:3035-3040.
277. **Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton.** 2000. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**:501-510.
278. **Shetron-Rama, L. M., H. Marquis, H. G. A. Bouwer, and N. E. Freitag.** 2002. Intracellular Induction of *Listeria monocytogenes* actA Expression. *Infect. Immun.* **70**:1087-1096.
279. **Simonen, M., and I. Palva.** 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* **57**:109-137.
280. **Souders, N. C., T. Verch, and Y. Paterson.** 2006. In Vivo Bactofection: *Listeria* Can Function as a DNA-Cancer Vaccine. *DNA and Cell Biology* **25**:142-151.
281. **Soussi, N., G. Milon, J. H. Colle, E. Mougneau, N. Glaichenhaus, and P. L. Goossens.** 2000. *Listeria monocytogenes* as a short-lived delivery system for the induction of type 1 cell-mediated immunity against the p36/LACK antigen of *Leishmania major*. *Infect Immun.* **68**:1498-1506.
282. **Stack, H. M., R. D. Sleator, M. Bowers, C. Hill, and C. G. M. Gahan.** 2005. Role for HtrA in Stress Induction and Virulence Potential in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4241-4247.
283. **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. Bouwer.** 2004. *Listeria monocytogenes* as a vaccine vector: virulence attenuation or existing antivector immunity does not diminish therapeutic efficacy. *J. Immunol.* **173**:420-427.

284. **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**:112-119.
285. **Stetson, D. B., and R. Medzhitov.** 2006. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* **24**:93-103.
286. **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**:1479-1490.
287. **Strehl, B., U. Seifert, E. Kruger, S. Heink, U. Kuckelkorn, and P. M. Kloetzel.** 2005. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol. Rev.* **207**:19-30.
288. **Stritzker, J.** 2001. Untersuchungen zur Verbesserung der DNA-Übertragung in Animalzellen durch *Listeria monocytogenes*. Universität Würzburg, Würzburg.
289. **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**:5622-5629.
290. **Suarez, M., B. Gonzalez-Zorn, Y. Vega, I. Chico-Calero, and J. A. Vazquez-Boland.** 2001. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell. Microbiol.* **3**:853-864.
291. **Sun, J. C., and M. J. Bevan.** 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**:339-342.
292. **Sundquist, M., C. Johansson, and M. J. Wick.** 2003. Dendritic cells as inducers of antimicrobial immunity in vivo. *Apmis.* **111**:715-724.
293. **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**:757-767.
294. **Swain, S. L., H. Hu, and G. Huston.** 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* **286**:1381-1383.
295. **Tabe, L., P. Krieg, R. Strachan, D. Jackson, E. Wallis, and A. Colman.** 1984. Segregation of mutant ovalbumins and ovalbumin-globin fusion proteins in *Xenopus* oocytes. Identification of an ovalbumin signal sequence. *J. Mol. Biol.* **180**:645-666.
296. **Tam, M. A., and M. J. Wick.** 2004. Dendritic cells and immunity to *Listeria*: TipDCs are a new recruit. *Trends Immunol.* **25**:335-339.
297. **Tang, P., I. Rosenshine, P. Cossart, and B. B. Finlay.** 1996. Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells. *Infect. Immun.* **64**:2359-2361.
298. **Tilney, L. G., and D. A. Portnoy.** 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Biol.*:1579-1608.
299. **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.
300. **Urban, J. L., H. M. Shepard, J. L. Rothstein, B. J. Sugarman, and H. Schreiber.** 1986. Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:5233-5237.

301. **Vassaux, G., J. Nitcheu, S. Jezzard, and N. R. Lemoine.** 2006. Bacterial gene therapy strategies. *The Journal of Pathology* **208**:290-298.
302. **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.
303. **Villadangos, J. A., P. Schnorrer, and N. S. Wilson.** 2005. Control of MHC-class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive factors. *Immunological Reviews* **207**:191-205.
304. **Villanueva, M. S., A. J. Sijts, and E. G. Pamer.** 1995. Listeriolysin is processed efficiently into an MHC class I-associated epitope in *Listeria monocytogenes*-infected cells. *J. Immunol.* **155**:5227-5233.
305. **Vukov, N., I. Moll, U. Blasi, S. Scherer, and M. J. Loessner.** 2003. Functional regulation of the *Listeria monocytogenes* bacteriophage A118 holin by an intragenic inhibitor lacking the first transmembrane domain. *Molecular Microbiology* **48**:173-186.
306. **Weiss, S., and S. Krusch.** 2001. Bacteria-mediated transfer of eukaryotic expression plasmids into mammalian host cells. *Biol. Chem.* **382**:533-541.
307. **Wendlinger, G., M. J. Loessner, and S. Scherer.** 1996. Bacteriophage receptors on *Listeria monocytogenes* cells are the N-acetylglucosamine and rhamnose substituents of teichoic acids or the peptidoglycan itself. *Microbiology* **142 (Pt 4)**:985-992.
308. **Whittaker, G. R., M. Kann, and A. Helenius.** 2000. Viral entry into the nucleus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**:627-651.
309. **WHO.** 1980. Global eradication of smallpox. *Bulletin of the World Health Organization* **58**:163.
310. **Wiethoff, C. M., and C. R. Middaugh.** 2003. Barriers to nonviral gene delivery. *J. Pharm. Sci.* **92**:203-217.
311. **Wong, P., and E. G. Pamer.** 2003. Feedback regulation of pathogen-specific T cell priming. *Immunity* **18**:499-511.
312. **Yadava, A., and C. F. Ockenhouse.** 2003. Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Infect. Immun.* **71**:4961-4969.
313. **Yewdell, J. W., E. Reits, and J. Neefies.** 2003. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nature Reviews Immunology* **3**:952-961.
314. **Yoshikawa, H., I. Kawamura, M. Fujita, H. Tsukada, M. Arakawa, and M. Mitsuyama.** 1993. Membrane damage and interleukin-1 production in murine macrophages exposed to listeriolysin O. *Infect. Immun.* **61**:1334-1339.
315. **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**:389-394.
316. **Young, R.** 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.* **56**:430-481.
317. **Zelmer, A., S. Krusch, A. Koschinski, M. Rohde, H. Repp, T. Chakraborty, and S. Weiss.** 2005. Functional transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: a mechanistic approach. *The Journal of Gene Medicine* **7**:1097-1112.

318. **Zimmerman, B. T., B. P. Canono, and P. A. Campbell.** 1986. Silica decreases phagocytosis and bactericidal activity of both macrophages and neutrophils in vitro. *Immunology* **59**:521-525.
319. **Zinkernagel, R. M.** 2003. On natural and artificial vaccinations. *Annual Review of Immunology* **21**:515-546.
320. **Zinkernagel, R. M., and P. C. Doherty.** 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* **248**:701-702.
321. **Zwickey, H. L., and T. A. Potter.** 1999. Antigen secreted from noncytosolic *Listeria monocytogenes* is processed by the classical MHC class I processing pathway. *J. Immunol.* **162**:6341-6350.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------|---|
| 7-AAD | 7-Actinomycin C |
| aa | Aminosäuren |
| Abb. | Abbildung |
| APC | „antigen presenting cell“, antigenpräsentierende Zelle |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSS | „balanced salt solution“ |
| CMV | Zytomegalievirus |
| CTL | „cytotoxic T lymphocyte“, zytotoxische T-Lymphozyte |
| DAPI | 4,6-Diamidino-2-Phenylindol |
| DC | „dendritic cells“, Dendritische Zellen |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate |
| DMEM | „Dulbecco´s Mod Eagle Medium“ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| ds | doppelsträngig |
| dsDNA | „double strain“ DNA, doppelsträngige DNA |
| DZ | Durchflußzytometrie |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECL | „enhanced chemiluminescence“, verstärkte Chemolumineszenz |
| EDTA | Ethylen-Diamin-tetra-Essigsäure |
| EGFP | „enhanced green fluorescent protein“ |
| Em | Erythromycin |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| ES | Elispot |
| <i>et al.</i> | und andere |
| Fa. | Firma |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |
| FKS | Fötales Kälberserum |
| H ₂ O _{dest.} | destilliertes Wasser |
| <i>i. v.</i> | intravenös |
| Ig | Immunglobuline, Antikörper |
| IL | Interleukin |
| Kb | Kilobasen |
| kD | Kilodalton |
| <i>Lm</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MØ | Makrophagen |
| MHC | „major histocompatibility complex“ |
| MO | Mikroorganismus |
| MOI | „multiplicity of infection“ |
| MQ-H ₂ O | Millipore-Wasser |
| NK | natürliche Killerzellen |
| OD _x | optische Dichte bei x nm |
| OVA | Ovalbumin |
| P | Promotor |
| <i>p. i.</i> | „post infection“, nach Infektion |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAMP | „pathogen associated molecular patterns“ |
| PCR | „polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion |
| PE-Cy5 | Phycoerythrin-Cy5.5 |

| | |
|--------------|--|
| Pfu | „ <i>Pyrococcus furiosus</i> “ |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| poly A | Polyadenylierungssignal |
| PRR | „pattern recognition receptor“ |
| RIPA | Radioimmunopräzipitation |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | „rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute |
| RPMI | „Rosewell Park Memorial Institute“ |
| RT | Raumtemperatur |
| SCID | „severe combined immunodeficiency“ |
| SDS | Natrium-dodecylsulfat |
| spp. | „species pluralis“, viele oder alle Arten der Gattung |
| ssDNA | „single strain“ DNA, einzelsträngige DNA |
| stud. T-Test | studentischer T-Test |
| Tab. | Tabelle |
| TAP-1/TAP-2 | „transporters associated with antigen processing-1 and -2“ |
| Taq | „ <i>Thermus aquaticus</i> “ |
| Tc | Tetracyclin |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TCR | „T cell receptor“, T-Zellrezeptor |
| TLR | „toll-like receptor“ |
| Tris | Tris-(hydroxy-ethyl)-aminomethan |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinsäure |
| TrpRS | Tryptophanyl-tRNA-Synthetase |
| <i>trpS</i> | Gen welches für die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase kodiert |
| U | „units“, Einheiten |
| u. | und |
| u. a. | unter anderem |
| ÜN | Übernacht |
| Vol. | Volumen |
| Vt | Volumenteile |
| WHO | „World Health Organization“ |
| WT | Wildtyp |

9.1 OVA-Sequenz für das Plasmid pSP118-P_{CMV}OVA

Dicke Schrift: kodierender Genbereich
 Blau: Primer
 Grün: eingefügte Restriktionsschnittstellen

```

                NotI                Ova2(F)
1  AAAAAAGCGG CCGCGCCACC ATGGGCTCCA TCGGCGCAGC AAGCATGGAA
   TTTTTTCGCC GCGCGCGGTGG TACCCGAGGT AGCCGCGTCG TTCGTACCTT
                Ova(b)
51 TTTTGTTTTG ATGTATTCAA GGAGCTCATC AATTCCTGGG TAGAAAGTCA
   AAAACAAAAC TACATAAGTT CCTCGAGTAG TTAAGGACCC ATCTTTCAGT
                Ova(a)
101 GACAAATGGA ATTATCAGAA ATGTCCTTCA GCCAAGCTCC GTGGATTCTC
   CTGTTTACCT TAATAGTCTT TACAGGAAGT CGGTTTCGAGG CACCTAAGAG

151 AAACGCAAT GGTTCGGTT AATGCCATTG TCTTCAAAGG ACTGTGGGAG
   TTTGACGTTA CCAAGACCAA TTACGGTAAC AGAAGTTTCC TGACACCCTC

201 AAAACATTTA AGGATGAAGA CACACAAGCA ATGCCTTTCA GAGTGACTGA
   TTTTGTAAT  TCCTACTTCT GTGTGTTTCGT TACGGAAAGT CTCACTGACT

251 GCAAGAAAGC AAACCTGTGC AGATGATGTA CCAGATTGGT TTATTTAGAG
   CGTTCCTTCG TTTGGACACG TCTACTACAT GGTCTAACCA AATAAAATCTC

301 TGGCATCAAT GGCTTCTGAG AAAATGAAGA TCCTGGAGCT TCCATTTGCC
   ACCGTAGTTA CCGAAGACTC TTTTACTTCT AGGACCTCGA AGGTAAACGG

351 AGTGGGACAA TGAGCATGTT GGTGCTGTTG CCTGATGAAG TCTCAGGCCT
   TCACCCTGTT ACTCGTACAA CCACGACAAC GGACTACTTC AGAGTCCGGA

401 TGAGCAGCTT GAGAGTATAA TCAACTTTGA AAAACTGACT GAATGGACCA
   ACTCGTCGAA CTCTCATATT AGTTGAAACT TTTTGACTGA CTTACCTGGT

451 GTTCTAATGT TATGGAAGAG AGGAAGATCA AAGTGTACTT ACCTCGCATG
   CAAGATTACA ATACCTTCTC TCCTTCTAGT TTCACATGAA TGGAGCGTAC

501 AAGATGGAGG AAAAATACAA CCTCACATCT GTCTTAATGG CTATGGGCAT
   TTCTACCTCC TTTTATGTT GGAGTGTAGA CAGAATTACC GATACCCGTA

551 TACTGACGTG TTTAGCTCTT CAGCCAATCT GTCTGGCATC TCCTCAGCAG
   ATGACTGCAC AAATCGAGAA GTCGGTTAGA CAGACCGTAG AGGAGTCGTC

601 AGAGCCTGAA GATATCTCAA GCTGTCCATG CAGCACATGC AGAAATCAAT
   TCTCGGACTT CTATAGAGTT CGACAGGTAC GTCGTGTACG TCTTTAGTTA

651 GAAGCAGGCA GAGAGGTGGT AGGGTCAGCA GAGGCTGGAG TGGATGCTGC
   CTTCGTCCGT CTCTCCACCA TCCCAGTCGT CTCCGACCTC ACCTACGACG
    
```

```

701  AAGCGTCTCT GAAGAATTTA GGGCTGACCA TCCATTCTC TTCTGTATCA
      TTCGCAGAGA CTTCTTAAAT CCCGACTGGT AGGTAAGGAG AAGACATAGT

751  AGCACATCGC AACCAACGCC GTTCTCTTCT TTGGCAGATG TGTTTCCCCT
      TCGTGTAGCG TTGGTTGCGG CAAGAGAAGA AACCGTCTAC ACAAAGGGGA
      NotI

801  TAAGCGGCCG CTTTTTTT
      ATTCGCCGGC GAAAAAA
                        Ova(R)

```

9.2 Sequenz der OVA-Expressionskassette (P_{actA} -*ova*) für das Plasmid pSPO- P_{actA} OVA

Dicke Schrift: kodierender Genbereich
 Grün: eingefügte Restriktionsschnittstellen
 Rot: Terminator des *inlA*-Gens
 Grau: Promotorsequenz des *actA*-Gens
 Blau: Primer

```

      PstI           XbaI           PactA(XbaI)
1    CTGCAGGTCG ACTCTAGAGT TGGGGTTAAC TGATTAACAA ATGTTAGAGA
      GACGTCCAGC TGAGATCTCA ACCCCAATTG ACTAATTGTT TACAATCTCT

51   AAAATTAATT CTCCAAGTGA TATTCTTAAA ATAATTCATG AATATTTTTTT
      TTTTAATTAA GAGGTTCACT ATAAGAATTT TATTAAGTAC TTATAAAAAA

101  CTTATATTAG CTAATTAAGA AGATAACTAA CTGCTAATCC AATTTTTTAAC
      GAATATAATC GATTAATTCT TCTATTGATT GACGATTAGG TTAAAAAATTG

151  GGAACAAATT AGTGAAAATG AAGGCCGAAT TTTCTTGTT CTAAAAAGGT
      CCTTGTTTTAA TCACTTTTAC TTCCGGCTTA AAAGGAACAA GATTTTTTCCA

201  TGTATTAGCG TATCACGAGG AGGGAGTATA AGTGGCTGCA TTCATCAATT
      ACATAATCGC ATAGTGCTCC TCCCTCATAT TCACCGACGT AAGTAGTTAA

251  CCTGGGTAGA AAGTCAGACA AATGGAATTA TCAGAAATGT CCTTCAGCCA
      GGACCCATCT TTCAGTCTGT TTACCTTAAT AGTCTTTACA GGAAGTCGGT
      PactA(PstI)
301  AGCTCCGTGG ATTCTCAAAC TGCAATGGTT CTGGTTAATG CCATTGTCTT
      TCGAGGCACC TAAGAGTTTG ACGTTACCAA GACCAATTAC GGTAACAGAA

351  CAAAGGACTG TGGGAGAAAA CATTTAAGGA TGAAGACACA CAAGCAATGC
      GTTTCCTGAC ACCCTCTTTT GTAAATTCTT ACTTCTGTGT GTTCGTTACG

401  CTTTCAGAGT GACTGAGCAA GAAAGCAAAC CTGTGCAGAT GATGTACCAG
      GAAAGTCTCA CTGACTCGTT CTTTCGTTTG GACACGTCTA CTACATGGTC

451  ATTGGTTTAT TTAGAGTGGC ATCAATGGCT TCTGAGAAAA TGAAGATCCT
      TAACCAAATA AATCTCACCG TAGTTACCGA AGACTCTTTT ACTTCTAGGA

501  GGAGCTTCCA ITTGCCAGTG GGACAATGAG CATGTTGGTG CTGTTGCCTG
      CCTCGAAGGT AAACGGTCAC CCTGTTACTC GTACAACCAC GACAACGGAC

551  ATGAAGTCTC AGGCCTTGAG CAGCTTGAGA GTATAATCAA CTTTGAAAAA
      TACTTCAGAG TCCGGAACTC GTCGAACTCT CATATTAGTT GAAACTTTTT

```

```

601  CTGACTGAAT GGACCAGTTC TAATGTTATG GAAGAGAGGA AGATCAAAGT
      GACTGACTTA CCTGGTCAAG ATTACAATAC CTTCTCTCCT TCTAGTTTCA

651  GTACTTACCT CGCATGAAGA TGGAGGAAAA ATACAACCTC ACATCTGTCT
      CATGAATGGA GCGTACTTCT ACCTCCTTTT TATGTTGGAG TGTAGACAGA

701  TAATGGCTAT GGGCATTACT GACGTGTTTA GCTCTTCAGC CAATCTGTCT
      ATTACCGATA CCCGTAATGA CTGCACAAAT CGAGAAGTCG GTTAGACAGA

751  GGCATCTCCT CAGCAGAGAG CCTGAAGATA TCTCAAGCTG TCCATGCAGC
      CCGTAGAGGA GTCGTCTCTC GGACTTCTAT AGAGTTCGAC AGGTACGTCG

801  ACATGCAGAA ATCAATGAAG CAGGCAGAGA GGTGGTAGGG TCAGCAGAGG
      TGTACGTCTT TAGTTACTTC GTCCGTCTCT CCACCATCCC AGTCGTCTCC

851  CTGGAGTGGA TGCTGCAAGC GTCTCTGAAG AATTTAGGGC TGACCATCCA
      GACCTCACCT ACGACGTTCT CAGAGACTTC TTAAATCCCC ACTGGTAGGT

901  TTCCTCTTCT GTATCAAGCA CATCGCAACC AACGCCGTTT TCTTCTTTGG
      AAGGAGAAGA CATAGTTCGT GTAGCGTTGG TTGCGGCAAG AGAAGAAAACC

951  CAGATGTGTT TCCCCTTATG CATAGAAGTA GTGTAAAGAG CTAGATGTGG
      GTCTACACAA AGGGGAATAC GTATCTTCAT CACATTTCTC GATCTACACC

1001 TTTTCGGACT ATATCTAGCT TTTTATTTTT TTAATAACCC GGGTACCGAG
      AAAAGCCTGA TATAGATCGA AAAAAATAAA AATTATTGGG CCCATGGCTC

1051 CTC
      GAG

```

9.3 Sequenz der OVA-Expressionskassette (P_{hly} -*ova*) für das Plasmid pSPO- P_{hly} OVA

Dicke Schrift: kodierender Genbereich
 Grün: eingefügte Restriktionsschnittstellen
 Rot: Terminator des *inlA*-Gens
 Grau: Promotorsequenz des *hly*-Gens
 Blau: Primer

```

          PstI           XbaI           Phly(XbaI)
1  TCGACCTGCA GGTTCGACTCT AGATATCTTA AAGTGACTTTT TATGTTGAGG
   AGCTGGACGT CCAGCTGAGA TCTATAGAAT TTCACTGAAA ATACAACCTCC

51  CATTAAACATT TGTTAACGAC GATAAAGGGA CAGCAGGACT AGAATAAAGC
   GTAATTGTAA ACAATTGCTG CTATTTCCCT GTCGTCTCGA TCTTATTTCTG

101 TATAAAGCAA GCATATAATA TTGCGTTTCA TCTTTAGAAG CGAATTTCTGC
   ATATTTCTGTT CGTATATTAT AACGCAAAGT AGAAATCTTC GCTTAAAGCG

151 CAATATTATA ATTATCAAAA GAGAGGGGTG GCAAACGGTA TTTGGCATTG
   GTTATAATAT TAATAGTTTT CTCTCCCCAC CGTTTGCCAT AAACCGTAAT

201 TTAGGTTAAA AAATGTAGAA GGAGAGTGAA ACCCATGACT GCATTCATCA
   AATCCAATTT TTTACATCTT CCTCTCACTT TGGGTACTGA CGTAAGTAGT

251 ATTCTGGGT AGAAAGTCAG ACAAATGGAA TTATCAGAAA TGTCTTCAG
   TAAGGACCCA TCTTTTCAGTC TGTTTACCTT AATAGTCTTT ACAGGAAGTC
   Phly(PstI)

```

```

301  CCAAGCTCCG TGGATTCTCA AACTGCAATG GTTCTGGTTA ATGCCATTGT
      GGTTCGAGGC ACCTAAGAGT TTGACGTTAC CAAGACCAAT TACGGTAACA

351  CTTCAAAGGA CTGTGGGAGA AAACATTTAA GGATGAAGAC ACACAAGCAA
      GAAGTTTCCT GACACCCTCT TTTGTAAATT CCTACTTCTG TGTGTTTCGTT

401  TGCCTTTTCAG AGTGACTIONGAG CAAGAAAGCA AACCTGTGCA GATGATGTAC
      ACGGAAAGTC TCACTGACTC GTTCTTTTCGT TTGGACACGT CTACTACATG

451  CAGATTGGTT TATTTAGAGT GGCATCAATG GCTTCTGAGA AAATGAAGAT
      GTCTAACCAA ATAAATCTCA CCGTAGTTAC CGAAGACTCT TTTACTTTCTA

501  CCTGGAGCTT CCATTTGCCA GTGGGACAAT GAGCATGTTG GTGCTGTTGC
      GGACCTCGAA GGTAAACGGT CACCCTGTTA CTCGTACAAC CACGACAACG

551  CTGATGAAGT CTCAGGCCTT GAGCAGCTTG AGAGTATAAT CAACTTTGAA
      GACTACTTCA GAGTCCGGAA CTCGTGCAAC TCTCATATTA GTTGAAACTT

601  AAACTGACTG AATGGACCAG TTCTAATGTT ATGGAAGAGA GGAAGATCAA
      TTTGACTGAC TTACCTGGTC AAGATTACAA TACCTTCTCT CCTTCTAGTT

651  AGTGTACTTA CCTCGCATGA AGATGGAGGA AAAATACAAC CTCACATCTG
      TCACATGAAT GGAGCGTACT TCTACCTCCT TTTTATGTTG GAGTGTAGAC

701  TCTTAATGGC TATGGGCATT ACTGACGTGT TTAGCTCTTC AGCCAATCTG
      AGAATTACCG ATACCCGTAA TGACTGCACA AATCGAGAAG TCGGTTAGAC

751  TCTGGCATCT CCTCAGCAGA GAGCCTGAAG ATATCTCAAG CTGTCCATGC
      AGACCGTAGA GGAGTCGTCT CTCGGACTTC TATAGAGTTC GACAGGTACG

801  AGCACATGCA GAAATCAATG AAGCAGGCAG AGAGGTGGTA GGGTCAGCAG
      TCGTGTACGT CTTTAGTTAC TTCGTCCGTC TCTCCACCAT CCCAGTCGTC

851  AGGCTGGAGT GGATGCTGCA AGCGTCTCTG AAGAATTTAG GGCTGACCAT
      TCCGACCTCA CCTACGACGT TCGCAGAGAC TTCTTAAATC CCGACTGGTA

901  CCATTCCTCT TCTGTATCAA GCACATCGCA ACCAACGCCG TTCTCTTCTT
      GGTAAGGAGA AGACATAGTT CGTGTAGCGT TGGTTGCGGC AAGAGAAGAA

951  TGGCAGATGT GTTTCCCCTT ATGCATAGAA GTAGTGTAAG GAGCTAGATG
      ACCGTCTACA CAAAGGGGAA TACGTATCTT CATCACATTT CTCGATCTAC

1001 TGGTTTTTCGG ACTATATCTA GCTTTTTTTAT TTTTTAATAA CCCGGGTACC
      ACCAAAGCC TGATATAGAT CGAAAAAATA AAAAAATTATT GGGCCCATGG

      SacI
1051 GAGCTCTCGA G
      CTCGAGAGCT C

```

9.4 IE1-Sequenz für das Plasmid pSP118- P_{CMV} IE1

Dicke Schrift: kodierender Genbereich des *ie1*-Gens

Blau: Primer

Grün: eingefügte Restriktionsschnittstellen

```

      NotI                IE1(NotI)-for
1  GCGGCCGCTC GCCACCATGG AGCCCGCCGC ACCCAGTTGC AACATGATCA
      CGCCGGCGAG CGGTGGTACC TCGGGCGGCG TGGGTCAACG TTGTACTAGT

```

51 TGATCGCCGA TCAGGCATCC GTCAACGCC ACGGCCGTCA CTTGGATGAG
ACTAGCGGCT AGTCCGTAGG CAGTTGCGGG TGCCGGCAGT GAACCTACTC

101 AACCGTGTCT ACCCATCAGA CAAGGTGCCA GCTCATGTCG CCAACAAGAT
TTGGCACAGA TGGGTAGTCT GTTCCACGGT CGAGTACAGC GGTGTGTCTA

151 CCTCGAGTCT GGAACCGAAA CCGTCCGCTG TGACCTGACT CTGGAGGACA
GGAGCTCAGA CTTTGGCTTT GGCAGGCGAC ACTGGACTGA GACCTCCTGT

201 TGTGTTGGGAGA CTATGAGTAT GATGATCCCA CTGAGGAAAGA GAAGATCCTC
ACAACCCTCT GATACTCATA CTACTAGGGT GACTCCTTCT CTTCTAGGAG

251 ATGGACCGCA TCGCTGACCA CGTGGGGAAT GATAACAGCG ACATGGCCAT
TACCTGGCGT AGCGACTGGT GCACCCCTTA CTATTGTCGC TGTACCGGTA

301 CAAGCATGCT GCAGTGAGGA GCGTTCTGTT GTCCTGTAAG ATTGCACACC
GTTTCGTACGA CGTCACTCCT CGCAAGACAA CAGGACATTC TAACGTGTGG

351 TCATGATAAA ACAGAACTAT CAATCAGCCA TCAACTCTGC TACCAACATT
AGTACTATTT TGTCTTGATA GTTAGTCGGT AGTTGAGACG ATGGTTGTAA

401 CTCTGTCAGC TAGCCAATGA TATCTTCGAG CGCATCGAAA GACAACGCAA
GAGACAGTCG ATCGGTTACT ATAGAAGCTC GCGTAGCTTT CTGTTGCGTT

451 GATGATATAC GGCTGTTTCA GATCTGAGTT TGATAATGTC CAGCTAGGGA
CTACTATATG CCGACAAAGT CTAGACTCAA ACTATTACAG GTCGATCCCT

501 GGCTCATGTA TGACATGTAC CCACACTTCA TGCCCACTAA TCTAGGGCCC
CCGAGTACAT ACTGTACATG GGTGTGAAAGT ACGGGTGATT AGATCCCGGG

551 TCAGAAAAGA GAGTCTGGAT GAGCTACGTA GGTGAGGCCA TAGTGGCAGC
AGTCTTTTCT CTCAGACCTA CTCGATGCAT CCACTCCGGT ATCACCCTCG

601 CACCAACATT GACCACGCAC TAGATGAGCG TGCCGCATGG GCCAAGACTG
GTGGTTGTAA CTGGTGCGTG ATCTACTCGC ACGGCGTACC CGGTTCTGAC

651 ATTGTTTCATT GCCTGGGGAG TTTAAGTCAG AGATGTGTGT CCTGGTTGGG
TAACAAGTAA CGGACCCCTC AAATTTCAGTC TCTACACACA GGACCAACCC

701 GCCATCAGGA GGCTTCATGA TCCACCCTGT TACACCAAGC CTTTCCTGGA
CGGTAGTCCT CCGAAGTACT AGGTGGGACA ATGTGGTTCG GAAAGGACCT

751 TGCCAGGTCT CAGCTGGCAG TATGGCAGCA GATGAAGGCT ATAGAGAGTG
ACGGTCCAGA GTCGACCGTC ATACCGTCGT CTACTTCCGA TATCTCTCAC

801 AGAGCGTATC CACACATGTG GTAGTGGTGG AAGCTTTGAA GCTCAGGGAG
TCTCGCATAG GTGTGTACAC CATCACCACC TTCGAAACTT CGAGTCCCTC

851 AATCTGGCTA AGGCAGTGCA GGAAACGATT GCCTATGAGA GACACCAATA
TTAGACCGAT TCCGTCACGT CCTTTGCTAA CGGATACTCT CTGTGGTTAT

901 TCACAGGGTG TGTCAGATGA TGTGTAATAA CATGAAAGAC CATCTAGAGA
AGTGTCCCAC ACAGTCTACT ACACATTATT GTACTTTCTG GTAGATCTCT

951 CCACCTGTAT GCTGGCCAGA GGCAGAACCT TGGCTACCTT AGCTGATCTG
GGTGGACATA CGACCGGTCT CCGTCTTGGA ACCGATGGAA TCGACTAGAC

1001 AGGAGCACCA GATACAATCT AGCACTTTTT CTTCTGAGTG AGATGCACAT
TCCTCGTGGT CTATGTTAGA TCGTGAAAAA GAAGACTCAC TCTACGTGTA

1051 CTTTGATAGC TTCACCATGC CTAGGATCAG AGGTGCTATG AAACAAGCAA
GAAACTATCG AAGTGGTACG GATCCTAGTC TCCACGATAC TTTGTTTCGTT

```

1101  GGTGTATGAG TTATGTGGAG AGGACCATCT CTCTGGCCAA GTTCAGAGAG
      CCACATACTC AATACACCTC TCCTGGTAGA GAGACCGGTT CAAGTCTCTC

1151  CTAGCTGATA GAGTCCATAA CAGGAGTGCA CCATCACCCC AGGGAGTGAT
      GATCGACTAT CTCAGGTATT GTCCTCACGT GGTAGTGGGG TCCCTCACTA

1201  AGAAGAACAG CAGCAGGCAG GGGAGGAAGA ACAGCAACAG CAGCAGGAGA
      TCTTCTTGTC GTCGTCCGTC CCCTCCTTCT TGTCGTTGTC GTCGTCTCTC

1251  TAGAGTATGA TCCTGAGATG CCCCCTCTGG AAAGAGAGGA AGAGCAGGAG
      ATCTCATACT AGGACTCTAC GGGGGAGACC TTTCTCTCCT TCTCGTCTCTC

1301  GATGAGCAGG TAGAGGAGGA GCCCCTGCA GATGAGGAGG AAGGAGGAGC
      CTACTCGTCC ATCTCCTCCT CGGGGGACGT CTACTCCTCC TTCCTCCTCG

1351  TGTGGGTGGT GTCACTCAAG AGGAACCTGC TGGTGAAGCC ACTGAGGAAG
      ACAACCACCA CAGTGAGTTC TCCTTGACG ACCACTTCGG TGA CTCTCTC

1401  CTGAAGAAGA TGAGTCCCAG CCTGGACCAA GTGACAACCA GGTGGTACCT
      GACTTCTTCT ACTCAGGGTC GGACCTGGTT CACTGTTGGT CCACCATGGA

1451  GAGTCTTCAG AGACACCAAC ACCTGCTGAG GATGAGGAGA CCCAAAGTGC
      CTCAGAAGTC TCTGTGGTTG TGGACGACTC CTACTCCTCT GGGTTTCACG

1501  TGATGAAGGA GAATCTCAGG AGCTGGAAGG ATCACAGCAA CTCATCCTAT
      ACTACTTCCT CTTAGAGTCC TCGACCTTCC TAGTGTGCGTT GAGTAGGATA

1551  CCAGACCTGC TGCCCCTCTG ACTGACAGCG AAAGTATTG TGATTCTGAA
      GGTCTGGACG ACGGGGAGAC TGACTGTGCG TTTGACTAAG ACTAAGACTT

1601  GATGATGATG AGGTGACCCG CATCCCAGTG GGATTCAGTC TCATGACATC
      CTACTACTAC TCCACTGGGC GTAGGGTCAC CCTAAGTCAG AGTACTGTAG

1651  TCCTGTCTTG CAACCTACGA CCAGATCTGC AACAGCGGCA GCTTCTTCTG
      AGGACAGGAC GTTGGATGCT GGTCTAGACG TTGTCGCCGT CGAAGAAGAC

1701  GCACTGCTCC TCGCCCAGCT CTCAAGAGGC AGTACGCCAT GGTGCATACC
      CGTGACGAGG AGCGGGTCGA GAGTTCTCCG TCATGCGGTA CCACGTATGG

1751  AGATCCAAGT CTTCTGAGAA TCAACAGCAG CCCAAGAAGA AGAGCAAGAA
      TCTAGGTTCA GAAGACTCTT AGTTGTCGTC GGGTTCTTCT TCTCGTTCTT

      NotI
1801  GTGAGCGGCC GCAAAAAA
      CACTCGCCGG CGAAAAAA
                        IEI(NotI)-rev

```

9.5 IE1-Sequenz für das Plasmid pSP118-PS_{actA}IE1

Dicke Schrift: kodierender Genbereich des *ie1*-Gens

Blau: Primer

Grün: eingefügte Restriktionsschnittstellen

```

      NsiI          IEI(NsiI)-for
1  TTTGCAGATG CATTTCATGGA GCCGCGGCA CCCAGTTGCA ACATGATCAT
      AAACGTCTAC GTAAGTACCT CGGGCGGCGT GGGTCAACGT TGTACTAGTA

```

51 GATCGCCGAT CAGGCATCCG TCAACGCCCA CGGCCGTCAC TTGGATGAGA
CTAGCGGCTA GTCCGTAGGC AGTTGCGGGT GCCGGCAGTG AACCTACTCT

101 ACCGTGTCTA CCCATCAGAC AAGGTGCCAG CTCATGTCGC CAACAAGATC
TGGCACAGAT GGGTAGTCTG TTCCACGGTC GAGTACAGCG GTTGTCTAG

151 CTCGAGTCTG GAACCGAAAC CGTCCGCTGT GACCTGACTC TGGAGGACAT
GAGCTCAGAC CTTGGCTTTG GCAGGCGACA CTGGACTGAG ACCTCCTGTA

201 GTTGGGAGAC TATGAGTATG ATGATCCCAC TGAGGAAGAG AAGATCCTCA
CAACCCTCTG ATACTCATACT TACTAGGGTG ACTCCTTCTC TTCTAGGAGT

251 TGGACCGCAT CGCTGACCAC GTGGGGAATG ATAACAGCGA CATGGCCATC
ACCTGGCGTA GCGACTGGTG CACCCCTTAC TATTGTGCGT GTACCGGTAG

301 AAGCATGCTG CAGTGAGGAG CGTTCTGTTG TCCTGTAAGA TTGCACACCT
TTCGTACGAC GTCACTCCTC GCAAGACAAC AGGACATTCT AACGTGTGGA

351 CATGATAAAA CAGAACTATC AATCAGCCAT CAACTCTGCT ACCAACATTC
GTACTATTTT GTCTTGATAG TTAGTCGGTA GTTGAGACGA TGGTTGTAAG

401 TCTGTGAGCT AGCCAATGAT ATCTTCGAGC GCATCGAAAAG ACAACGCAAG
AGACAGTCGA TCGGTTACTA TAGAAGCTCG CGTAGCTTTC TGTTCGCTTC

451 ATGATATACG GCTGTTTTAG ATCTGAGTTT GATAATGTCC AGCTAGGGAG
TACTATATGC CGACAAAGTC TAGACTCAA CTATTACAGG TCGATCCCTC

501 GCTCATGTAT GACATGTACC CACACTTCAT GCCCACTAAT CTAGGGCCCT
CGAGTACATA CTGTACATGG GTGTGAAGTA CGGGTGATTA GATCCCGGGA

551 CAGAAAAGAG AGTCTGGATG AGCTACGTAG GTGAGGCCAT AGTGGCAGCC
GTCTTTTCTC TCAGACCTAC TCGATGCATC CACTCCGGTA TCACCGTCGG

601 ACCAACATTG ACCACGCACT AGATGAGCGT GCCGCATGGG CCAAGACTGA
TGGTTGTAAC TGGTGCCTGA TCTACTCGCA CGGCGTACCC GGTCTGACT

651 TTGTTTATTG CCTGGGGAGT TTAAGTCAGA GATGTGTGTC CTGGTTGGGG
AACAAGTAAC GGACCCCTCA AATTTCAGTCT CTACACACAG GACCAACCCC

701 CCATCAGGAG GCTTCATGAT CCACCCTGTT ACACCAAGCC TTTCTGGAT
GGTAGTCCTC CGAAGTACTA GGTGGGACAA TGTGGTTCGG AAAGGACCTA

751 GCCAGGTCTC AGCTGGCAGT ATGGCAGCAG ATGAAGGCTA TAGAGAGTGA
CGGTCCAGAG TCGACCGTCA TACCGTCGTC TACTTCCGAT ATCTCTCACT

801 GAGCGTATCC ACACATGTGG TAGTGGTGGG AGCTTTGAAAG CTCAGGGAGA
CTCGCATAGG TGTGTACACC ATCACCACCT TCGAAACTTC GAGTCCCTCT

851 ATCTGGCTAA GGCAGTGCAG GAAACGATTG CCTATGAGAG ACACCAATAT
TAGACCGATT CCGTCACGTC CTTTGCTAAC GGATACTCTC TGTGGTTATA

901 CACAGGGTGT GTCAGATGAT GTGTAATAAC ATGAAAGACC ATCTAGAGAC
GTGTCCACA CAGTCTACTA CACATTATTG TACTTTCTGG TAGATCTCTG

951 CACCTGTATG CTGGCCAGAG GCAGAACCTT GGCTACCTTA GCTGATCTGA
GTGGACATAC GACCGGTCTC CGTCTTGGA CCGATGGAAT CGACTAGACT

1001 GGAGCACCAG ATACAATCTA GCACTTTTTT TTCTGAGTGA GATGCACATC
CCTCGTGGTC TATGTTAGAT CGTGAAAAG AAGACTCACT CTACGTGTAG

1051 TTTGATAGCT TCACCATGCC TAGGATCAGA GGTGCTATGA AACAAGCAAG
AAACTATCGA AGTGGTACGG ATCCTAGTCT CCACGATACT TTGTTTCGTT

```

1101  GTGTATGAGT TATGTGGAGA GGACCATCTC TCTGGCCAAG TTCAGAGAGC
      CACATACTCA ATACACCTCT CCTGGTAGAG AGACCGGTTT AAGTCTCTCG

1151  TAGCTGATAG AGTCCATAAC AGGAGTGCAC CATCACCCCA GGGAGTGATA
      ATCGACTATC TCAGGTATTG TCCTCACGTG GTAGTGGGGT CCCTCACTAT

1201  GAAGAACAGC AGCAGGCAGG GGAGGAAGAA CAGCAACAGC AGCAGGAGAT
      CTTCTTGTCG TCGTCCGTCC CCTCCTTCTT GTCGTTGTCG TCGTCCTCTA

1251  AGAGTATGAT CCTGAGATGC CCCCTCTGGA AAGAGAGGAA GAGCAGGAGG
      TCTCATACTA GGACTCTACG GGGGAGACCT TTCTCTCCTT CTCGTCCTCC

1301  ATGAGCAGGT AGAGGAGGAG CCCCTGCAG ATGAGGAGGA AGGAGGAGCT
      TACTCGTCCA TCTCCTCCTC GGGGGACGTC TACTCCTCCT TCCTCCTCGA

1351  GTTGGTGGTG TCACTCAAGA GGAACCTGCT GGTGAAGCCA CTGAGGAAGC
      CAACCACCAC AGTGAGTTCT CCTTGGACGA CCACTTCGGT GACTCCTTCG

1401  TGAAGAAGAT GAGTCCCAGC CTGGACCAAG TGACAACCAG GTGGTACCTG
      ACTTCTTCTA CTCAGGGTCG GACCTGGTTC ACTGTTGGTC CACCATGGAC

1451  AGTCTTCAGA GACACCAACA CCTGCTGAGG ATGAGGAGAC CCAAAGTGCT
      TCAGAAGTCT CTGTGGTTGT GGACGACTCC TACTCCTCTG GGTTCACGA

1501  GATGAAGGAG AATCTCAGGA GCTGGAAGGA TCACAGCAAC TCATCCTATC
      CTACTTCCTC TTAGAGTCCT CGACCTTCCT AGTGTCGTTG AGTAGGATAG

1551  CAGACCTGCT GCCCTCTGA CTGACAGCGA AACTGATTCT GATTCTGAAG
      GTCTGGACGA CGGGGAGACT GACTGTCGCT TTGACTAAGA CTAAGACTTC

1601  ATGATGATGA GGTGACCCGC ATCCAGTGG GATTGAGTCT CATGACATCT
      TACTACTACT CCACTGGGCG TAGGGTCACC CTAAGTCAGA GTACTGTAGA

1651  CCTGTCCTGC AACCTACGAC CAGATCTGCA ACAGCGGCAG CTTCTTCTGG
      GGACAGGACG TTGGATGCTG GTCTAGACGT TGTCGCCGTC GAAGAAGACC

1701  CACTGCTCCT CGCCCAGCTC TCAAGAGGCA GTACGCCATG GTGCATACCA
      GTGACGAGGA GCGGGTCGAG AGTTCTCCGT CATGCGGTAC CACGTATGGT

1751  GATCCAAGTC TTCTGAGAAT CAACAGCAGC CCAAGAAGAA GAGCAAGAAG
      CTAGGTTTCTG AAGACTCTTA GTTGTGTCG GGTCTTCTT CTCGTTCTTC
      NsiI
1801  ATGCATAGA
      TACGTATCT
      IE1(NsiI)-rev

```

9.5 IE1-Sequenz für das Plasmid pCSB-IE1

Dicke Schrift: kodierender Genbereich des *ie1*-Gens

Blau: Primer

Grün: eingefügte Restriktionsschnittstellen

Grau: IRES

```

      XmaI      IRES-XmaI-for
1  GAATTGCCCG GGATCCGCCC CTCTCCCTCC CCCCCCCTA ACGTTACTGG
      CTTAACGGGC CCTAGGCGGG GAGAGGGAGG GGGGGGGGAT TGCAATGACC

```

51 CCGAAGCCGC TTGGAATAAG GCCGGTGTGC GTTTGTCTAT ATGTTATTTT
GGCTTCGGCG AACCTTATTC CGGCCACACG CAAACAGATA TACAATAAAA

101 CCACCATATT GCCGTCTTTT GGCAATGTGA GGGCCCGGAA ACCTGGCCCT
GGTGGTATAA CGGCAGAAAA CCGTTACACT CCCGGGCCTT TGGACCGGGA

151 GTCTTCTTGA CGAGCATTCC TAGGGGTCTT TCCCCTCTCG CCAAAGGAAT
CAGAAGAACT GCTCGTAAGG ATCCCCAGAA AGGGGAGAGC GGTTCCTTA

201 GCAAGGTCTG TTGAATGTCG TGAAGGAAGC AGTTCCTCTG GAAGCTTCTT
CGTTCCAGAC AACTTACAGC ACTTCCTTCG TCAAGGAGAC CTTCGAAGAA

251 GAAGACAAAC AACGTCTGTA GCGACCCTTT GCAGGCAGCG GAACCCCCCA
CTTCTGTTTG TTGCAGACAT CGCTGGGAAA CGTCCGTCGC CTTGGGGGGT

301 CCTGGCGACA GGTGCCTCTG CGGCCAAAAG CCACGTGTAT AAGATACACC
GGACCGCTGT CCACGGAGAC GCCGGTTTTT GGTGCACATA TTCTATGTGG

351 TGCAAAGGCG GCACAACCCG AGTGCCACGT TGTGAGTTGG ATAGTTGTGG
ACGTTTTCCGC CGTGTGGGGG TCACGGTGCA ACACTCAACC TATCAACACC

401 AAAGAGTCAA ATGGCTCTCC TCAAGCGTAT TCAACAAGGG GCTGAAGGAT
TTTCTCAGTT TACCGAGAGG AGTTCGCATA AGTTGTTCCC CGACTTCCTA

451 GCCCAGAAGG TACCCATTG TATGGGATCT GATCTGGGGC CTCGGTGCAC
CGGGTCTTCC ATGGGGTAAC ATACCCTAGA CTAGACCCCG GAGCCACGTG

501 ATGCTTTACA TGTGTTTAGT CGAGGTTAAA AAAACGTCTA GGCCCCCGA
TACGAAATGT ACACAAATCA GCTCCAATTT TTTTGCAGAT CCGGGGGGCT
IRES-IE1

551 ACCACGGGGA CGTGGTTTTT CTTTGAAAA CACGATGATA ATATGGCCAC
TGGTGCCCCCT GCACCAAAAAG GAAACTTTTT GTGCTACTAT TATACCGGTG

601 AACCATGGAG CCCGCCGCAC CCAGTTGCAA CATGATCATG ATCGCCGATC
TTGGTACCTC GGGCGGCGTG GGTCAACGTT GTACTAGTAC TAGCGGCTAG
IE1-IRES

651 AGGCATCCGT CAACGCCAC GGCCGTCACT TGGATGAGAA CCGTGTCTAC
TCCGTAGGCA GTTGCGGGTG CCGGCAGTGA ACCTACTCTT GGCACAGATG

701 CCATCAGACA AGGTGCCAGC TCATGTCGCC AACAAGATCC TCGAGTCTGG
GGTAGTCTGT TCCACGGTCG AGTACAGCGG TTGTTCTAGG AGCTCAGACC

751 AACCGAAACC GTCCGCTGTG ACCTGACTCT GGAGGACATG TTGGGAGACT
TTGGCTTTGG CAGGCACAC TGGACTGAGA CCTCCTGTAC AACCTCTGA

801 ATGAGTATGA TGATCCCACT GAGGAAGAGA AGATCCTCAT GGACCGCATC
TACTCATACT ACTAGGGTGA CTCCTTCTCT TCTAGGAGTA CCTGGCGTAG

851 GCTGACCACG TGGGGAATGA TAACAGCGAC ATGGCCATCA AGCATGCTGC
CGACTGGTGC ACCCCTTACT ATTGTGCTG TACCGGTAGT TCGTACGACG

901 AGTGAGGAGC GTTCTGTTGT CCTGTAAGAT TGCACACCTC ATGATAAAAC
TCACTCCTCG CAAGACAACA GGACATTCTA ACGTGTGGAG TACTATTTTG

951 AGAACTATCA ATCAGCCATC AACTCTGCTA CCAACATTCT CTGTCAGCTA
TCTTGATAGT TAGTCGGTAG TTGAGACGAT GGTTGTAAGA GACAGTCGAT

1001 GCCAATGATA TCTTCGAGCG CATCGAAAGA CAACGCAAGA TGATATACGG
CGGTTACTAT AGAAGCTCGC GTAGCTTTCT GTTGCGTTCT ACTATATGCC

1051 CTGTTTCAGA TCTGAGTTTG ATAATGTCCA GCTAGGGAGG CTCATGTATG

| | | | | | |
|------|--|--|--|--|--|
| 1101 | GACAAAGTCT ACATGTACCC TGTACATGGG | AGACTCAAAC ACACTTCATG TGTGAAGTAC | TATTACAGGT CCCACTAATC GGGTGATTAG | CGATCCCTCC TAGGGCCCTC ATCCCAGGAG | GAGTACATAC AGAAAAGAGA TCTTTTCTCT |
| 1151 | GTCTGGATGA CAGACCTACT | GCTACGTAGG CGATGCATCC | TGAGGCCATA ACTCCGGTAT | GTGGCAGCCA CACCGTCGGT | CCAACATTGA GGTTGTAACT |
| 1201 | CCACGCACTA GGTGCGTGAT | GATGAGCGTG CTACTCGCAC | CCGCATGGGC GGCGTACCCG | CAAGACTGAT GTTCTGACTA | TGTTCAATTGC ACAAGTAACG |
| 1251 | CTGGGGAGTT GACCCCTCAA | TAAGTCAGAG ATTCAGTCTC | ATGTGTGTCC TACACACAGG | TGGTTGGGGC ACCAACCCCG | CATCAGGAGG GTAGTCCTCC |
| 1301 | CTTCATGATC GAAGTACTAG | CACCCTGTTA GTGGGACAAT | CACCAAGCCT GTGGTTCGGA | TTCCTGGATG AAGGACCTAC | CCAGGTCTCA GGTCCAGAGT |
| 1351 | GCTGGCAGTA CGACCGTCAT | TGGCAGCAGA ACCGTCGTCT | TGAAGGCTAT ACTTCCGATA | AGAGAGTGAG TCTCTCACTC | AGCGTATCCA TCGCATAGGT |
| 1401 | CACATGTGGT GTGTACACCA | AGTGGTGGAA TCACCACCTT | GCTTTGAAGC CGAAACTTCG | TCAGGGAGAA AGTCCCTCTT | TCTGGCTAAG AGACCGATTC |
| 1451 | GCAGTGCAGG CGTCACGTCC | AAACGATTGC TTTGCTAACG | CTATGAGAGA GATACTCTCT | CACCAATATC GTGGTTATAG | ACAGGGTGTG TGTCCCACAC |
| 1501 | TCAGATGATG AGTCTACTAC | TGTAATAACA ACATTATTGT | TGAAAGACCA ACTTTCTGGT | TCTAGAGACC AGATCTCTGG | ACCTGTATGC TGGACATACG |
| 1551 | TGGCCAGAGG ACCGGTCTCC | CAGAACCTTG GTCTTGGAAC | GCTACCTTAG CGATGGAATC | CTGATCTGAG GACTAGACTC | GAGCACCAGA CTCGTGGTCT |
| 1601 | TACAATCTAG ATGTTAGATC | CACTTTTTCT GTGAAAAGA | TCTGAGTGAG AGACTCACTC | ATGCACATCT TACGTGTAGA | TTGATAGCTT AACTATCGAA |
| 1651 | CACCATGCCT GTGGTACGGA | AGGATCAGAG TCCTAGTCTC | GTGCTATGAA CACGATACTT | ACAAGCAAGG TGTTCGTTCC | TGTATGAGTT ACATACTCAA |
| 1701 | ATGTGGAGAG TACACCTCTC | GACCATCTCT CTGGTAGAGA | CTGGCCAAGT GACCGGTTCA | TCAGAGAGCT AGTCTCTCGA | AGCTGATAGA TCGACTATCT |
| 1751 | GTCCATAACA CAGGTATTGT | GGAGTGCACC CCTCACGTGG | ATCACCCAG TAGTGGGGTC | GGAGTGATAG CCTCACTATC | AAGAACAGCA TTCTTGTCGT |
| 1801 | GCAGGCAGGG CGTCCGTCCC | GAGGAAGAAC CTCCTTCTTG | AGCAACAGCA TCGTTGTCGT | GCAGGAGATA CGTCCCTAT | GAGTATGATC CTCATACTAG |
| 1851 | CTGAGATGCC GACTCTACGG | CCCTCTGGAA GGGAGACCTT | AGAGAGGAAG TCTCTCCTTC | AGCAGGAGGA TCGTCTCTCT | TGAGCAGGTA ACTCGTCCAT |
| 1901 | GAGGAGGAGC CTCCTCCTCG | CCCCTGCAGA GGGGACGTCT | TGAGGAGGAA ACTCCTCCTT | GGAGGAGCTG CCTCCTCGAC | TTGGTGGTGT AACCACCACA |
| 1951 | CACTCAAGAG GTGAGTTCTC | GAACCTGCTG CTTGGACGAC | GTGAAGCCAC CACTTCGGTG | TGAGGAAGCT ACTCCTTCGA | GAAGAAGATG CTTCTTCTAC |
| 2001 | AGTCCCAGCC TCAGGGTCGG | TGGACCAAGT ACCTGGTTCA | GACAACCAGG CTGTTGGTCC | TGGTACCTGA ACCATGGACT | GTCTTCAGAG CAGAAGTCTC |
| 2051 | ACACCAACAC TGTGGTTGTG | CTGCTGAGGA GACGACTCCT | TGAGGAGACC ACTCCTCTGG | CAAAGTGCTG GTTTCACGAC | ATGAAGGAGA TACTTCCTCT |
| 2101 | ATCTCAGGAG TAGAGTCCTC | CTGGAAGGAT GACCTTCCTA | CACAGCAACT GTGTCGTTGA | CATCCTATCC GTAGGATAGG | AGACCTGCTG TCTGGACGAC |

2151 CCCCTCTGAC TGACAGCGAA ACTGATTCTG ATTCTGAAGA TGATGATGAG
GGGGAGACTG ACTGTCGCTT TGACTAAGAC TAAGACTTCT ACTACTACTC

2201 GTGACCCGCA TCCCAGTGGG ATTCAGTCTC ATGACATCTC CTGTCCTGCA
CACTGGGCGT AGGGTCACCC TAAGTCAGAG TACTGTAGAG GACAGGACGT

2251 ACCTACGACC AGATCTGCAA CAGCGGCAGC TTCTTCTGGC ACTGCTCCTC
TGGATGCTGG TCTAGACGTT GTCGCCGTCG AAGAAGACCG TGACGAGGAG

2301 GCCCAGCTCT CAAGAGGCAG TACGCCATGG TGCATACCAG ATCCAAGTCT
CGGGTCGAGA GTTCTCCGTC ATGCGGTACC ACGTATGGTC TAGGTTTCTCAGA
NotI

2351 TCTGAGAATC AACAGCAGCC CAAGAAGAAG AGCAAGAAGT GAGCGGCCGC
AGACTCTTAG TTGTCGTCGG GTTCTTCTTC TCGTTCTTCA CTCGCCGGCG

2401 AAAAAA
TTTTTT
IEI-NotI-rev

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Daniela Inge Martina Löffler
Geboren: 04.09.1976 in Haßfurt
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1986-07/1989 Grundschule Haßfurt
09/1989-06/1996 Regiomontanus-Gymnasium, Haßfurt
Abitur

Hochschulbildung

Berufsausbildung Biologin
Abschluss Diplom-Biologin Univ.

09/1996-07/2002 Studium der Biologie an der Universität Würzburg
Hauptstudium mit den Schwerpunkten:
Mikrobiologie, Biochemie, Humangenetik, Tierphysiologie

09/2001-07/2002 Diplomarbeit mit dem Thema: „Untersuchungen der Interaktion von
Internalinen mit nicht-phagozytischen Zelllinien“

07/2002 Abschluss als Diplom-Biologin Univ. mit der Gesamtnote sehr gut

Hilfswissenschaftliche Tätigkeit

08/2002-10/2002 wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität
Würzburg

Promotionsstudium

seit 11/2002 Promotionsstudium mit dem Thema „Untersuchungen virulenzattenuierter *L. monocytogenes* Stämme als Impfstoffträger im Mausmodell“ am Lehrstuhl
für Mikrobiologie der Universität Würzburg

11/2002-10/2005 Teilnahme am Graduiertenkolleg 520 „Immunomodulation“ der Universität
Würzburg

09/2005 Forschungsaufenthalt in Vancouver, Kanada

Publikationen

- **Schoen, C., Kolb-Mäurer, A., Geginat, G., Löffler, D., Bergmann, B., Stritzker, J., Szalay, A. A., Pilgrim, S., Goebel, W.** 2005. Bacterial delivery of functional messenger RNA to mammalian cells. *Cell Microbiol.* May; 7(5):709-24.
- **Pilgrim, S., Schoen, C., Stritzker, J., Frentzen, A, Loeffler, D., Gentschev, I. and W. Goebel.** 2005. Virulence-attenuated intracellular bacterial pathogens as tools for the development of novel live vaccines. *Nova Acta Leopoldina NF 92, Nr. 344, 235-240*
- **Loeffler, D. I. M., Schoen, C. U., Goebel, W., Pilgrim S.** Comparison of different live vaccine strategies *in vivo* for delivery of protein antigen or antigen-encoding DNA and mRNA by virulence-attenuated *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* (in press).

Posterbeiträge

- Daniela Löffler, Christoph Schoen, Werner Goebel and Sabine Pilgrim (2004). Delivery of DNA, RNA and protein antigens by *Listeria monocytogenes*. International Symposium "Threat of Infection". Würzburg.
- Christoph Schoen, Annette Kolb-Mäurer, Gernot Geginat, Daniela Löffler, Birgit Bergmann, Jochen Stritzker, Sabine Pilgrim, Werner Goebel (2004). RNA delivery to mammalian cells with *Listeria monocytogenes*. International Symposium "Threat of Infection". Würzburg.
- Daniela Löffler, Christoph Schoen, Werner Goebel and Sabine Pilgrim (2004). Delivery of DNA, RNA and protein antigens by *Listeria monocytogenes*. 1st Graduate Day der Universität Würzburg. Würzburg.
- Daniela Löffler, Christoph Schoen, Gernot Geginat, Werner Goebel and Sabine Pilgrim (2004). Delivery of DNA, RNA and protein antigens by *Listeria monocytogenes*. XV International Symposium on Problems of Listeriosis (ISOPOL XV). Uppsala. Sweden.
- Daniela Löffler, Sabine Pilgrim, Werner Goebel (2005). Virulence-attenuated *Listeria monocytogenes* strains used as carriers in the development of novel live vaccines. Internationale Konferenz "New Approaches to Vaccine Development". Berlin

Vorträge

- „Delivery of DNA, mRNA or proteins into host cells by *Listeria monocytogenes*“ (2005). BC Research Institute for Children´s and Women´s Health. Vancouver, Kanada
- „Delivery of DNA, mRNA or proteins into host cells by *Listeria monocytogenes*“. (2005) Department of Immunology, University of Washington. Seattle, USA.
- „Delivery of DNA, mRNA or proteins into host cells by *Listeria monocytogenes*“ (2006). “Young Investigator Symposium on Infection Biology”. Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie. Berlin.