

**Experimentelle Immunisierungen
gegen das Leberstadium
der *Plasmodium berghei* Malaria-Infektion**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Susanne Tartz

aus Leipzig

beim Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

Hamburg, August 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. B. FLEISCHER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Frau Priv.-Doz. Dr. I. BRUCHHAUS
Tag der Disputation: 22. September 2006

Hamburg, den 20. August 2006




Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Bernhard Fleischer für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für das interessante Arbeitsthema und die kompetente Betreuung der Arbeit.

Frau Dr. Iris Bruchhaus danke ich für ihre Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachterin zu lesen und zu bewerten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Jacobs für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen konstruktiven Anregungen.

Herrn Dr. Peter Sebo danke ich für die Kooperation auf dem Gebiet der Adenylatcyclase, die Herstellung der Adenylatcyclase-Konstrukte und seine vielen nützlichen Anregungen und Ideen.

Herrn Dr. Holger Rüssmann danke ich für die Kooperation auf dem Gebiet der Salmonellen, die Bereitstellung der zur Klonierung der Salmonellen benötigten Materialien und seine vielen hilfreichen Tipps.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für das nette Arbeitsklima bedanken. Nicht zuletzt gilt Iris Gaworski und Christiane Steeg mein besonderer Dank für die vielen praktischen Tipps und Anregungen.

Abkürzungsverzeichnis

ACT	<i>B. pertussis</i> Adenylatcyclase
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>boost</i>	Zweitimmunisierung
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BTLA	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (<i>cluster of differentiation</i>)
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CSP	Circumsporoziten-Protein
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
DC	Dendritische Zelle
ddNTP	Didesoxyribonukleotridtriphosphat
dest.	Destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleotide acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot assay
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead/winged helix transcription factor 3</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
ICOS	<i>Inducible costimulator</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	intravenös

kD	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MHC I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>) Klasse I/II
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Verhältnis Bakterien:Wirtszellen
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
OT	Ovalbumin-transgen
OVA	Ovalbumin
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an H ₃ O ⁺
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
PE	Phycoerythrin
<i>prime</i>	primäre Immunisierung
PRR	Rezeptor für PAMPS (<i>pattern recognition receptor</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RTX	<i>Repeats in toxin</i> - Proteinfamilie
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPI	Salmonella pathogenicity island - Gencluster
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
sfu	<i>spot forming unit</i>
T _{CM}	Zentrale Memory-T-Zelle
T _{EM}	Effektor-Memory-T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _H	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{Reg}	Regulatorische T-Zelle
YopE	<i>Yersinia outer protein E</i>

Einbuchstaben-Code der Aminosäuren:

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure	E	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

INHALT

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	Angeborene Immunabwehr.....	1
1.1.2	Adaptive Immunabwehr.....	2
1.1.3	Grundlagen der T-Zell-Aktivierung.....	3
1.1.4	Regulatorische T-Zellen.....	4
1.1.5	Costimulation.....	5
1.1.6	Memory-T-Zellen	6
1.2	Malaria	7
1.2.1	Erreger der Malaria	7
1.2.2	Lebenszyklus der Plasmodien.....	8
1.2.3	Pathogenese der <i>P. falciparum</i> -Infektion.....	10
1.2.4	Immunologie der erworbenen Immunität gegen Malaria.....	11
1.2.5	Vakzinierung gegen Malaria.....	12
1.3	<i>B. pertussis</i> Adenylatcyclase als Antigenträger	13
1.4	<i>Salmonella typhimurium</i> als Antigenträger	15
1.4.1	Der Typ III – Sekretionsapparat.....	15
1.4.2	Einsatz von <i>S. typhimurium</i> SB824 als Antigenträger	17
1.5	Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	18
2	MATERIAL	19
2.1	Herkunft häufig verwendeter Reagenzien und Materialien	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Plastikwaren.....	19
2.1.3	Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten.....	19
2.1.4	Reagenzien für biochemische Arbeiten	20
2.1.5	Reagenzien für zellbiologische Arbeiten	20
2.2	Enzyme	20
2.3	Plasmidvektoren	20
2.4	Oligonukleotid-Primer	21
2.5	Antikörper	21
2.6	Peptide	21
2.7	Kulturmedien	22
2.7.1	Medien für Bakterien	22

2.7.2	Medien für eukaryotische Zellen	22
2.8	Puffer und Stammlösungen	22
2.8.1	Puffer und Stammlösungen für molekularbiologische Arbeiten.....	22
2.8.2	Puffer und Stammlösungen für biochemische Arbeiten	23
2.8.3	Puffer und Stammlösungen für zellbiologische Arbeiten	24
2.9	Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere	25
2.10	Laborgeräte.....	25
3	METHODEN	27
3.1	Molekularbiologische Methoden	27
3.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
3.1.2	Agarosegelelektrophorese.....	28
3.1.3	Isolierung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen.....	28
3.1.4	Restriktionsverdau	29
3.1.5	Ligation.....	29
3.1.6	Transformation von kompetenten Bakterien.....	30
3.1.7	Plasmidpräparation aus Bakterien.....	32
3.1.8	DNA-Konzentrationsbestimmung	32
3.1.9	DNA-Sequenzierung.....	32
3.2	Mikrobiologische Methoden	34
3.2.1	Kultur von <i>Escherichia coli</i>	34
3.2.2	Kultur von <i>Salmonella typhimurium</i>	34
3.2.3	Einfrieren von Bakterien.....	34
3.3	Biochemische Methoden.....	34
3.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
3.3.2	Western Blot	35
3.3.3	Nachweis der Expression von YopE-CSP	36
3.4	Zellbiologische Methoden	37
3.4.1	Allgemeine Bedingungen der Zellkultur.....	37
3.4.2	Auftauen und Einfrieren eukaryotischer Zellen.....	37
3.4.3	Zellzählung	37
3.4.4	Zelllinien und ihre Kultur.....	38
3.4.5	<i>In vitro</i> Infektion eukaryotischer Zellen mit <i>S. typhimurium</i> SB824.....	38
3.4.6	Präparation muriner Milzzellen	38
3.4.7	Präparation muriner Leberzellen.....	38
3.4.8	Präparation von Zellen aus dem peripheren Blut.....	39
3.4.9	Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT).....	39

3.4.10	Messung der Zellproliferation.....	40
3.4.11	Immunfluoreszenz.....	40
3.4.12	Durchflusszytometrische Analysen.....	41
3.5	Tierversuche.....	42
3.5.1	Immunisierung mit <i>S. typhimurium</i> SB824.....	42
3.5.2	Persistenzanalyse	43
3.5.3	Immunisierung mit ACT-CSP	43
3.5.4	Infektion mit <i>P. berghei</i>	43
4	ERGEBNISSE	44
4.1	Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen	44
4.1.1	Klonierung des Expressionsvektors pST-TB.....	45
4.1.2	Expression des YopE-CSP-Fusionsmoleküls in Salmonellen	48
4.1.3	<i>In vitro</i> Nachweis der Prozessierung und MHC I-Präsentation des CSP-Epitops	49
4.1.4	Persistenz der rekombinanten Salmonellen in BALB/c-Mäusen und Plasmidstabilität	51
4.1.5	Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit <i>S. typhimurium</i> SB824 (pST-TB)	52
4.1.6	Memory-Antwort nach Immunisierung mit SB824 (pST-TB)	56
4.1.7	Protektion nach Immunisierung mit <i>S. typhimurium</i> SB824 (pST-TB).....	58
4.2	Immunisierung mit der rekombinanten Adenylatcyclase ACT-CSP	60
4.2.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung des Fusionsmoleküls ACT-CSP	61
4.2.2	Immunisierung von C57Bl/6- und BALB/c-Mäusen mit ACT-CSP	62
4.2.3	Homologe <i>prime/boost</i> -Immunisierung mit ACT-CSP	63
4.2.4	Blockade von CTLA-4 während der Immunisierung mit ACT-CSP	64
4.2.5	Memory-Antwort nach Immunisierung mit ACT-CSP und anti-CTLA-4.....	68
4.2.6	Protektion nach Immunisierung mit ACT-CSP und anti-CTLA-4	71
4.2.7	Nachweis Foxp3 ⁺ regulatorischer T-Zellen nach Immunisierung	73
4.3	Heterologe <i>prime/boost</i>-Immunisierungen.....	75
4.3.1	Analyse der T-Zellantwort nach heterologer <i>prime/boost</i> Immunisierung.....	76
4.3.2	Protektion nach heterologer <i>prime/boost</i> -Immunisierung	79
5	DISKUSSION	81
5.1	<i>S. typhimurium</i> als Antigenträger.....	81
5.1.1	<i>S. typhimurium</i> SB824 (pST-TB) induziert eine systemische CSP-spezifische Immunantwort	82
5.1.2	Problem der Persistenz und Plasmidstabilität bei <i>Salmonella</i>	83
5.2	<i>B. pertussis</i> Adenylatcyclase als Antigenträger.....	84

5.2.1	ACT-CSP induziert eine systemische CSP-spezifische Immunantwort	85
5.3	<i>S. typhimurium</i> SB824 (pST-TB) und ACT-CSP erzeugen CSP-spezifische Memory-T-Zellen.....	87
5.4	SB824 (pST-TB) und ACT-CSP erzeugen keine Protektion.....	88
5.5	CTLA-4-Blockade.....	90
5.5.1	CTLA-4-Blockade während der Zweitimmunisierung mit ACT-CSP verstärkt die primäre CSP-spezifische Antwort	90
5.5.2	In Kombination mit anti-CTLA-4 erzeugt ACT-CSP eine partielle protektive Immunität	91
5.6	Heterologe <i>prime/boost</i>-Immunisierungen.....	92
5.6.1	Die Reihenfolge der Immunisierung ist kritisch	92
5.6.2	Die heterologe <i>prime/boost</i> -Immunsierung mit SB824 (pST-TB) und ACT-CSP erzeugt eine sterile Immunität	93
5.7	Ausblick	94
6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	LITERATUR.....	99
	ANHANG I: DNA-Sequenz <i>P. berghei</i> CSP (Vektor pSG-pbCSP).....	111
	ANHANG II: Aminosäure-Sequenz <i>P. berghei</i> CSP	112
	ANHANG III: Vektor pST-TB.....	113

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Gefüge von Effektor- und Regulationsmechanismen. Es hat die Aufgabe, den Organismus vor pathogenen Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten zu schützen sowie maligne körpereigene Zellen zu entfernen, ohne dabei körpereigenes gesundes Gewebe zu schädigen. Eine zentrale Fähigkeit des Immunsystems ist es deshalb, zwischen körpereigenen Strukturen und fremden Antigenen beziehungsweise zwischen „gefährlich“ und „ungefährlich“ zu unterscheiden.

Das Immunsystem höherer Vertebraten setzt sich aus einer Vielzahl mobiler und sesshafter Zellen des hämatopoetischen Systems, löslichen Komponenten wie den Immunglobulinen, den Bestandteilen des Komplementsystems und den Zytokinen sowie den lymphatischen Organen und Geweben (Milz, Lymphknoten, Peyersche Plaques, Tonsillen, Thymus und Knochenmark) zusammen. Man unterscheidet zwischen angeborenen Abwehrmechanismen, die früh im Verlauf einer Infektion aktiviert werden und nicht antigenspezifisch sind, und der erworbenen, spezifischen Immunabwehr, die erst nach einer gewissen Latenzzeit in Kraft tritt (Übersicht bei Janeway et al., 1999).

1.1.1 Angeborene Immunabwehr

Zu den unspezifischen Schutzmechanismen gehören z.B. die Epithelien, die mechanische, chemische und mikrobiologische Barrieren für Mikroorganismen darstellen. Wenn ein Pathogen die epithelialen Barrieren überwunden hat, werden zunächst unspezifische zelluläre und humorale Abwehrmechanismen wirksam. Zu den zellulären Bestandteilen des unspezifischen Immunsystems gehören phagozytierende Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten sowie die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die zytotoxische Aktivität besitzen. Zu den humoralen Mechanismen zählen die Aktivierung des Komplementsystems sowie die Freisetzung unspezifischer Mediatoren wie Interferone und Interleukine. Eine zentrale Rolle bei der unspezifischen Abwehr spielt die Entzündungsreaktion, bei der zelluläre und humorale Komponenten der Immunabwehr lokal am Ort der Infektion aktiv werden. Im Rahmen dieser Entzündungsreaktion wird auch die spezifische Immunantwort eingeleitet, da

phagozytierende Zellen das Bindeglied zwischen der unspezifischen und der adaptiven Immunabwehr darstellen, indem sie als antigenpräsentierende Zellen (APZ) für die adaptive Immunabwehr fungieren.

1.1.2 Adaptive Immunabwehr

Das adaptive Immunsystem wird durch die B- und T-Lymphozyten gebildet. Beide gehen aus den im Knochenmark vorhandenen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen hervor (Abramson et al., 1977, Lemischka et al., 1986). Die Differenzierung zu reifen Lymphozyten findet in spezialisierten Geweben statt. B-Lymphozyten reifen im Knochenmark, T-Lymphozyten im Thymus. Der überwiegende Anteil von B- und T-Zellen ist in den lymphatischen Organen lokalisiert, während ein geringer Prozentsatz in Blut und Lymphe zirkuliert (Übersicht bei Janeway et al., 1999). Innerhalb dieses Systems vermitteln die B-Lymphozyten die humorale Immunität, indem sie Antigen-spezifische Immunglobuline sezernieren, während die T-Lymphozyten regulatorische und zellvermittelte Effektorfunktionen wahrnehmen.

T- und B-Lymphozyten erkennen Antigene über spezifische Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Der B-Zell-Rezeptor besteht aus membranständigen Immunglobulin-Molekülen. Durch Antigenkontakt wird die Differenzierung der B-Zelle zu einer Immunglobulin-sezernierenden Plasmazelle eingeleitet. Für die Aktivierung benötigt die B-Zelle zusätzlich noch Unterstützung von antigenspezifischen T-Helfer-Zellen (DeFranco, 1987). Im Rahmen der terminalen Differenzierung werden durch Selektion und somatische Hypermutation Plasmazellen, die hochaffine Antikörper sezernieren, sowie B-Gedächtnis-Zellen generiert.

T-Zellen erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) Peptide, die an MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) auf der antigenpräsentierenden Zelle gebunden sind. Der TCR besteht aus einem $\alpha\beta$ -Dimer (eine kleine Subpopulation der T-Zellen trägt einen $\gamma\delta$ -TCR) und ist mit dem so genannten CD3-Komplex eng assoziiert, der für die Signaltransduktion durch den TCR verantwortlich ist (Übersicht bei Weiss et al., 1994). Desweiteren gehören die Korezeptoren CD4 oder CD8 zum TCR-Komplex. Die Korezeptoren binden die MHC-Moleküle auf der antigenpräsentierenden Zelle. Dabei interagiert CD4 mit Molekülen der MHC-Klasse II und CD8 mit Molekülen der MHC-Klasse I. Ähnlich wie B-Zellen benötigen T-Zellen zur Aktivierung neben dem Antigenkontakt ein zweites, kostimulatorisches Signal. Dieses Signal wird von

Mitgliedern der B7-Proteinfamilie über den Rezeptor CD28 auf der T-Zelle vermittelt (Hathcock et al., 1994).

1.1.3 Grundlagen der T-Zell-Aktivierung

Naive T-Zellen zirkulieren durch Blut und Lymphe und passieren dabei regelmäßig Milz und Lymphknoten. Kommt es zu einer Infektion, wandern Antigen-beladene APZ in Milz und Lymphknoten ein. Wenn sie dort auf T-Zellen treffen, die einen spezifischen T-Zell-Rezeptor für das Antigen tragen, kommt es zur Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen APZ und T-Zelle. Dies bezeichnet die Stelle des Zell-Zell-Kontakts, an der es zur lokalen Anreicherung von TCR-Molekülen, Adhäsionsmolekülen, Costimulatoren und intrazellulären Signalmolekülen wie LCK und LAT kommt. Die dadurch ausgelösten Signalkaskaden induzieren die Proliferation (klonale Expansion) und Differenzierung in Effektor-T-Zellen.

CD4⁺ T-Lymphozyten erkennen ihr Antigen im Komplex mit MHC-Klasse II-Molekülen, die fast ausschließlich auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie Monozyten/Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert werden. MHC-Klasse II-Moleküle binden Peptide einer Länge von 12 bis 24 Aminosäuren, die in der Regel extrazellulären Ursprungs sind und durch Prozessierung des durch Phagozytose aufgenommenen Materials entstehen (Übersicht bei Germain, 1994). Man unterteilt aktivierte T-Helfer-Zellen nach dem Spektrum der von ihnen sezernierten Zytokine in mindestens drei Subpopulationen (T_{H1}, T_{H2}, T_{H3}) (Mosmann et al., 1996). Auf die Polarisierung aktivierter CD4⁺ T-Zellen zu einem T_{H1}- oder T_{H2}-Phänotyp hat das umgebende Zytokinmilieu, das durch APZ geschaffen wird, einen entscheidenden Einfluss. T_{H1}-Zellen, die durch die Produktion von IL-2, IFN- γ sowie GM-CSF gekennzeichnet sind, führen durch die Aktivierung von Makrophagen zu ausgeprägten Entzündungsreaktionen, die auch das Abtöten von intrazellulären Erregern ermöglichen. T_{H2}-Zellen sind durch die Freisetzung der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 charakterisiert und aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern.

CD8⁺ T-Zellen (CTL) können infizierte und maligne Körperzellen eliminieren. Sie werden durch Zellen aktiviert, auf deren Oberfläche ein passendes antigenes Peptid im Komplex mit MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert wird. MHC-Klasse I-Moleküle werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren Peptide, die eine Länge von 8 bis 10 Aminosäuren haben und in der Regel dem proteolytischen Abbau von

Proteinen im Zytosol entstammen (Übersicht bei Germain, 1994). Aktivierte CTL können Zielzellen töten, indem sie Vesikel freisetzen, die lytische Enzyme wie Granzyme und Perforin enthalten, oder sie induzieren die Apoptose der betreffenden Zelle über die Interaktion des Fas-Liganden mit Fas auf der Oberfläche der APZ (Übersicht bei Squier et al., 1994). Auf der anderen Seite sind $CD8^+$ T-Zellen eine wichtige Quelle von Zytokinen. In Anlehnung an den T_H1/T_H2 -Phänotyp der $CD4^+$ T-Zellen kann man auch bei $CD8^+$ T-Zellen zwischen Zellen, die vorwiegend $IFN\gamma$, und solchen, die vorwiegend IL-4, IL-5 und IL-10 sezernieren, unterscheiden (Übersicht bei Henkart et al., 2004).

Die Phase der klonalen Expansion spezifischer T-Zellen und Differenzierung zu Effektorzellen wird gefolgt von einer Phase der Kontraktion der Effektor-Zellpopulation. Die meisten Effektor-T-Zellen erliegen dem aktivierungsinduzierten Zelltod. Die Mechanismen dabei sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Negative Costimulatoren wie CTLA-4 und PD-1 sowie die Rezeptoren Fas und TNFR könnten hierbei eine Rolle spielen, aber auch das proinflammatorische Zytokin $IFN\gamma$ scheint wichtig für die Deletion vor allem von $CD8^+$ T-Zellen zu sein (Übersicht bei Sprent et al., 2002).

1.1.4 Regulatorische T-Zellen

Neben den Effektor-T-Zellen spielen regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) eine wichtige Rolle im Immunsystem. Sie begrenzen Effektor-T-Zellantworten und sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz. Man unterscheidet zwei Subpopulationen: natürliche und induzierte T_{Reg} . Die so genannten natürlichen T_{Reg} , die im Thymus entstehen, sind zentraler Bestandteil der peripheren Toleranz (Schwartz, 2005; Sakaguchi, 2005). Diese Zellen machen etwa 5-10% der $CD4^+$ T-Zellen aus. Zum anderen kommt es auch im Verlauf von Infektionen zur Entstehung von induzierten T_{Reg} (T_{R1} , T_{H3} oder $CD8^+ T_{Reg}$), die der Aktivierung der Effektor-T-Zellen entgegenwirken (Mills et al., 2004). Regulatorische T-Zellen nutzen verschiedene kontaktabhängige und -unabhängige Effektormechanismen. Dazu gehören die Rezeptoren CTLA-4 und GITR sowie die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β (McHugh et al., 2002; Chen et al., 1998; Fontenot et al., 2003). Ein spezifischer Marker für T_{Reg} ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead/winged helix transcription factor*), der ein zentraler Regulator in der Entstehung von T_{Reg} ist (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003).

1.1.5 Costimulation

Ein komplexes Gleichgewicht zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Signalen reguliert die Immunreaktion gegen Pathogene und die Erhaltung der Selbst-Toleranz. Die Hauptregulatoren dieses Gleichgewichts sind die Mitglieder der B7 / CD28 - Familie, die die Aktivierung, Inhibition und die Feinregulierung der T-Zellantwort steuern (Übersicht bei Greenwald et al., 2005).

Die Erkennung von Antigenen durch T-Zell-Rezeptoren führt in Abwesenheit von costimulatorischen Signalen zur Anergie der T-Zelle. Wird jedoch der auf T-Zellen konstitutiv exprimierte Rezeptor CD28 durch CD80 und CD86 (B7-1/ B7-2) auf der APZ stimuliert, kommt es zur Aktivierung der T-Zelle und Induktion von Effektorfunktionen. Weitere Mitglieder der CD28-Familie sind ICOS, CTLA-4, PD-1 und BTLA (Abb. 1.1). Die Expression dieser Costimulatoren wird infolge der T-Zellaktivierung induziert. Während ICOS ein weiterer aktivatorischer Costimulator ist, handelt es sich bei CTLA-4, PD-1 und BTLA um negative Regulatoren.

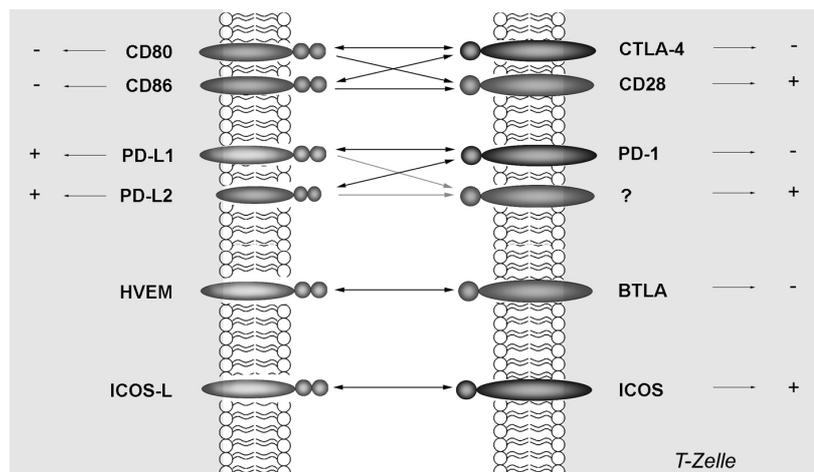


Abb. 1.1) Mitglieder der B7 - CD28-Familie

CD80 und CD86 binden an CD28 und sind die Haupt-Costimulatoren für naive T-Zellen. Demgegenüber führt die Bindung an CTLA-4 auf Effektor-T-Zellen zu deren Abschaltung. PD-L1 und PD-L2 vermitteln inhibitorische Signale über PD-1, jedoch wird die Existenz eines zweiten, stimulatorischen Rezeptors für PD-L1/2 postuliert. BTLA bindet den Liganden HVEM und löst ebenfalls inhibitorische Signale aus, während ICOS nach Bindung seines Liganden ICOSL stimulatorisch wirkt. CTLA-4 und PD-1 können hingegen bidirektional über ihre Liganden auch inhibitorische oder stimulatorische Signale an APZ vermitteln.

CTLA-4 ist neben CD28 ein Rezeptor für CD80 und CD86 und reguliert die Abschaltung aktivierter T-Zellen (Walunas et al., 1994; Krummel et al., 1995). Zudem wurde gezeigt,

dass die CTLA-4 / CD80/86 - Interaktion bidirektional verlaufen kann. CTLA-4 kann über CD80/86 auch negative Signale in andere T-Zellen oder APZ vermitteln (Grohmann et al., 2002). Dies ist einer der Mechanismen, über die regulatorische T-Zellen wirken können. Die Blockade der Interaktion zwischen CTLA-4 und CD80/86 mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen CTLA-4 bietet die Möglichkeit, in diese komplexe negative Regulation der T-Zellaktivität einzugreifen. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die CTLA-4-Blockade eine tumorspezifische T-Zellantwort verstärken kann (Leach et al., 1996; Hurwitz et al., 2000) und auch zu einer stärkeren T-Zellantwort nach einer Immunisierung führt (Gregor et al., 2004).

1.1.6 Memory-T-Zellen

Im Rahmen der primären Aktivierung von Effektor-T-Zellen entstehen auch Memory-T-Zellen, die zum Teil lebenslang persistieren und im Falle eines zweiten Antigenkontakts eine schnellere Immunantwort ermöglichen.

Anhand der Expression von Oberflächenmarkern, ihrer anatomischen Verteilung und ihrer immunologischen Funktion werden zwei Haupt-Populationen von Memory-T-Zellen unterschieden (Übersicht bei Sallusto et al., 2004). In der Maus sind alle Memory-T-Zellen durch eine hohe Expression des Hyaluronsäurerezeptors CD44 gekennzeichnet (Pihlgren et al., 1996). Die so genannten zentralen Memory-T-Zellen (T_{CM}) tragen zudem die Rezeptoren CD62L und CCR7 auf der Oberfläche, was ihnen die Zirkulation durch lymphoide Organe ermöglicht, wohingegen den Effektor-Memory-T-Zellen (T_{EM}) diese Rezeptoren fehlen. CD62L (L-Selectin) ist ein Homing-Rezeptor auf T-Zellen, der die Liganden CD34, GlyCAM u.a. auf Endothelien erkennt, und somit den Eintritt der T-Zelle in den Lymphknoten vermittelt (Rosen, 2004). CCR7 ist ein Chemokin-Rezeptor, der den Liganden SLC bindet und ebenfalls beim Eintritt der T-Zellen in die Lymphknoten und in die PALS-Region (*periarteriolar lymphoid sheath*) der Milz eine Rolle spielt (Potsch et al., 1999). T_{EM} exprimieren hingegen spezielle Integrine und Chemokin-Rezeptoren, die ihnen den Eintritt in nichtlymphoide Gewebe wie Leber und Lunge ermöglichen. Neben der unterschiedlichen Expression von Oberflächenmolekülen zeigen T_{CM} und T_{EM} auch unterschiedliche Funktionen. T_{EM} ähneln aktivierten Effektor-T-Zellen, sie produzieren konstitutiv Zytokine, haben zytotoxische Aktivität und können sofort nach Antigenkontakt Effektorfunktionen ausüben. Demgegenüber befinden sich

T_{CM} in einem Zustand ähnlich ruhenden T-Zellen, sie können jedoch nach Antigenkontakt sehr schnell proliferieren und zu Effektor-T-Zellen differenzieren.

Die Zahl der Memory-Zellen bleibt langfristig stabil, obwohl Memory-T-Zellen eine stärkere Proliferationsrate als naive T-Zellen aufweisen. Wahrscheinlich existiert ein genau reguliertes Gleichgewicht aus Zelltod und Proliferation. Für CD8⁺ Memory-T-Zellen wurde beispielsweise gezeigt, dass IL-15 und IL-7 eine TCR-unabhängige so genannte Bystander-Proliferation induzieren, der wiederum proapoptotische Signale entgegenwirken (Tan et al., 2002; McNally et al., 2001).

1.2 Malaria

Die Malaria ist eine durch Plasmodien verursachte Protozoeninfektion. Die natürliche Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt über weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles*. Die geographische Verbreitung korreliert mit der Verbreitung von als Überträger geeigneten *Anopheles*-Arten. Ein sehr hohes Malariarisiko besteht im tropischen Afrika, ein hohes bis mittleres Risiko in Südostasien und Teilen Mittel- und Südamerikas. Nach Schätzungen der WHO treten jährlich etwa 300 Millionen klinische Fälle auf (WHO, 1999). Etwa 1,5 Millionen Menschen versterben jährlich infolge der Erkrankung, die meisten davon sind Kinder im Alter unter fünf Jahren.

1.2.1 Erreger der Malaria

Die Erreger der Malaria sind Protozoen der Gattung *Plasmodium*. Es gibt vier humanpathogene Plasmodienarten, die sich morphologisch sowie im Verlauf der Malaria-Erkrankung unterscheiden (Übersicht bei Lang et al., 2000). *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, ist der häufigste und gefährlichste Malariaparasit. Die Malaria tropica ist die einzige Malariaform, die tödlich verlaufen kann. *P. vivax* und *P. ovale* sind die Erreger der Malaria tertiana, *P. malariae* verursacht die Malaria quartana.

Die Inkubationszeit nach der Übertragung der infektiösen Sporozoiten beträgt 8 bis 15 Tage, im Anschluss daran kommt es zum so genannten Malariaanfall, der von hohem Fieber begleitet wird. Dieser periodische Anfall ist bei allen Formen der Malaria das Hauptsymptom und steht im Zusammenhang mit der Freisetzung von Merozoiten aus parasitierten Erythrozyten (siehe Abschnitt 1.2.2). Er tritt bei der Malaria tertiana und bei

der Malaria quartana alle 48 bzw. 72 Stunden auf, während im Fall der Malaria tropica die Fieberanfälle häufig asynchron sind. Desweiteren kommt es im Verlauf der Infektion zu Vergrößerungen von Milz und Leber. Die Infektionen mit *P. vivax*, *P. malariae* und *P. ovale* haben häufig keine weiteren besonderen pathologischen Merkmale. Eine *P. falciparum*-Infektion kann jedoch schnell zu einer schweren, lebensbedrohlichen Malaria fortschreiten. Dabei ist die zerebrale Malaria einer der schwerwiegendsten pathologischen Prozesse. Charakteristisch dafür sind ödematöse Strukturen im Bereich der Meningen und der Hirnrinde sowie extensive Verstopfungen der Kapillaren durch parasitierte Erythrozyten mit ringförmigen Blutungen rund um die verstopften Gefäße. Infolge der Veränderungen im Gehirn kann es zu Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma kommen. Eine weitere häufige Komplikation bei *P. falciparum* Infektionen ist das Auftreten einer schweren Anämie durch direkte Schädigung der Erythrozyten sowie durch eine gestörte Erythropoiese. Andere häufige Komplikationen sind das akute Nierenversagen sowie das Auftreten von Lungenödem.

Zur Untersuchung der Immunologie der Malaria-Infektion stehen verschiedene Plasmodien-Spezies zur Verfügung, die pathogen für Nagetiere sind. Diese Mausmodelle bieten eine gute Möglichkeit, um die Pathogenese oder die Immunantwort im Verlauf der Erkrankung zu untersuchen (Übersicht bei Li et al., 2002). Einige Spezies wie *P. chabaudi adami* verursachen nicht lethale Infektionen, wobei die Parasiten nach Abklingen der akuten Parasitämie entweder vollständig eliminiert sind oder schwächere Rückfälle verursachen. Andere Spezies wie *P. berghei* führen generell zu lethalen Infektionen und eignen sich deshalb besonders für die Erprobung von Impfstoffen. Die *P. berghei*-Infektion dient außerdem als Modell zur Untersuchung der zerebralen Malaria. Weitere Plasmodien-Spezies wie *P. yoelii* oder *P. chabaudi chabaudi* verursachen Malaria-Erkrankungen, die je nach Plasmodien- und verwendetem Maus-Stamm lethal oder nicht lethal verlaufen.

1.2.2 Lebenszyklus der Plasmodien

Der Lebenszyklus der humanpathogenen Plasmodien verläuft als sexueller Zyklus (Sporogonie) in der *Anopheles*-Mücke und als asexueller Zyklus (Schizogonie) im Menschen (Übersicht bei Good et al., 1999). In der Abbildung 1.2 ist der Zyklus schematisch dargestellt.

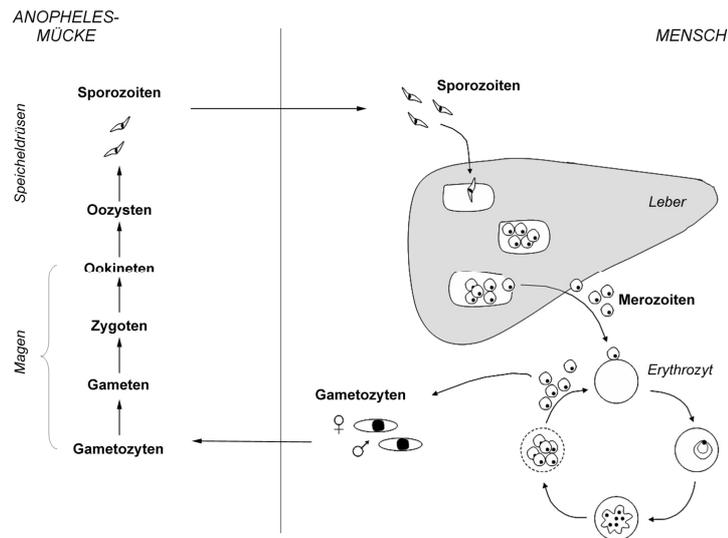


Abb. 1.2) Lebenszyklus der Plasmodien

In der Anopheles-Mücke vollzieht sich der sexuelle Zyklus (Sporogonie) der Plasmodien. Im Magen der Mücke kommt es zur Vereinigung der männlichen und weiblichen Gameten. Diese entwickeln sich zu Ookineten, die die Magenwände durchdringen und zu Oozysten ausreifen. Diese setzen Sporozoiten frei, die in die Speicheldrüsen gelangen und mit dem Speichel der Mücke bei einem Biss in das menschliche Blut übertragen werden. Im Menschen vollzieht sich der asexuelle Zyklus (Schizogonie). Die Sporozoiten dringen innerhalb kürzester Zeit in die Leberzellen ein und entwickeln sich dort zu Schizonten, die je bis zu 30000 Merozoiten freisetzen. Diese befallen die Erythrozyten im peripheren Blut. In den Erythrozyten bilden sich Ringformen aus, die sich zu Schizonten entwickeln und schließlich bis zu 30 neue Merozoiten freisetzen. Einige Merozoiten entwickeln sich zu männlichen und weiblichen Gametozyten, die bei einem erneuten Biss wieder in den Magen der Mücke gelangen.

In der Mücke vollzieht sich die Vereinigung der männlichen und weiblichen Gametozyten. Dieser Prozess findet im Magen der Mücke statt. Nach der Befruchtung entwickeln sich die Gameten zu Zygoten und schließlich zu den beweglichen Ookineten, die nach Durchdringung der Magenwände zu Oozysten werden. Diese setzen Sporozoiten frei, die in die Speicheldrüsen der Mücke gelangen und von dort bei einem Stich mit dem Speichel in das menschliche Blut übertragen werden. Dieser Zyklus in der *Anopheles* dauert je nach Außentemperatur 8 bis 16 Tage und findet unter 15°C nicht mehr statt.

Die in die menschliche Blutbahn gelangten Sporozoiten dringen innerhalb weniger Minuten in die Leberzellen ein. Wahrscheinlich spielt das Haupt-Oberflächenantigen der Sporozoiten, das Circumsporozoiten-Protein (CSP), eine entscheidende Rolle beim Befall der Hepatozyten, indem es spezifisch Heparansulfat auf den Leberzellen bindet (Chatterjee et al., 1995; Ancsin et al., 2004).

Die in die Hepatozyten gelangten Sporozoiten entwickeln sich zu Schizonten, die schließlich nach 7 bis 9 Tagen bis zu 30000 Merozoiten pro parasitierter Zelle freisetzen. Diese gelangen in das periphere Blut und infizieren dort die Erythrozyten. Nach Befall der Erythrozyten entwickeln sich die Merozoiten zu Ringformen, die zu amöboiden Trophozoiten heranwachsen und schließlich zu erythrozytären Schizonten ausreifen. Diese setzen 10 bis 30 Merozoiten frei, die erneut Erythrozyten befallen. Eine geringe Zahl der Merozoiten entwickelt sich zu Geschlechtsformen, den männlichen und weiblichen Gametozyten. Werden diese beim Stich der *Anopheles* aufgenommen, beginnt in der Mücke der sexuelle Zyklus von vorn.

1.2.3 Pathogenese der *P. falciparum*-Infektion

Die Pathologie der Malaria ist mit dem erythrozytären Zyklus der Infektion assoziiert. Die Schwere der Infektion wird von vielen Faktoren beeinflusst wie Alter, vorangegangene Malaria-Infektionen, Koinfektionen mit anderen Pathogenen usw. Ein wichtiger Faktor bei der Ausbildung pathologischer Symptome ist die Freisetzung großer Mengen proinflammatorischer Zytokine (Übersicht bei Clark et al., 2004). So werden bei der Zerstörung der parasitierten Erythrozyten so genannte Malaria-Toxine und Antigene freigesetzt, die eine vermehrte endogene Synthese von proinflammatorischen Zytokinen in pathologischen Mengen hervorrufen. Während geringe Mengen von proinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren einen protektiven, d.h. antiparasitären Effekt haben, ist die Überproduktion dieser Zytokine ursächlich an der Pathologie der Malaria-Infektion beteiligt. So führen zu hohe Konzentrationen an TNF- α , Lymphotoxin, IFN- γ , IL-1 und IL-6 zu Fieber, komatösen Bewusstseinsstörungen, einer abnormen Erythropoiese und einer erhöhten Zytoadhärenz (Riley et al., 1991; Lang et al., 2000). Die starke Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) führt zu hohen lokalen Stickstoffmonoxid (NO) -Konzentrationen im Gewebe und wird unter anderem mit der Entstehung zerebraler Symptome und mit immunsuppressiven Effekten im Verlauf der Erkrankung in Verbindung gebracht (Clark et al., 1992; Rockett et al., 1994). Andererseits ist eine hohe systemische NO-Konzentration im Serum häufig mit asymptomatischen *Plasmodium*-Infektionen assoziiert (Anstey et al., 1996).

Eine besondere Rolle bei der Pathogenese der Malaria scheint das Glycosylphosphatidylinositol (GPI) zu spielen. Es wurde gezeigt, dass GPI von *P. falciparum* in Makrophagen die Produktion von TNF- α und anderen proinflammatorischen Zytokinen

wie IL-1 sowie die Synthese der iNOS stimulieren kann (Schofield et al., 1993). Der Effekt des GPI beruht auf der Aktivierung von Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie und der Protein-Kinase C- ϵ , die Transkriptionsfaktoren der c-rel-Familie und NF- κ B aktivieren. Diese induzieren die Expression von TNF- α , IL-1 und iNOS sowie von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 (Tachado et al., 1997).

Die intrazellulären Parasiten induzieren in den Erythrozyten morphologische und biochemische Änderungen, die eine verstärkte Zytoadhärenz der Zellen zur Folge haben (Übersicht bei Cooke et al., 2001). Die Zusammenballung von parasitierten Erythrozyten und deren Sequestration am Endothel von Kapillaren und Venolen führt zu Mikrozirkulationsstörungen und trägt dazu bei, dass parasitierte Erythrozyten nicht in der Milz eliminiert werden können. Entgegen früherer Theorien ist die Sequestration aber wohl nicht die Ursache für zerebrale Symptome, die eher der lokalen Inflammation und metabolischem Stress wie Azidose und Hypoglykämie zugeschrieben werden (Miller et al., 2002). Zudem wurde gezeigt, dass *P. falciparum*-infizierte Erythrozyten die Funktion von dendritischen Zellen beeinflussen und auf diesem Wege direkt die Immunantwort modulieren können (Urban et al., 1999).

1.2.4 Immunologie der erworbenen Immunität gegen Malaria

Individuen, die in endemischen Gebieten wiederholt Malaria-Infektionen ausgesetzt sind, entwickeln langsam eine Immunität. Diese ist allerdings nicht steril, sondern führt zu sehr geringen Parasitämien ohne Krankheitserscheinungen. Der Erhalt dieser Immunität ist auf regelmäßige Neuinfektionen angewiesen (Lang et al., 2000).

Neugeborene in endemischen Gebieten sind zunächst relativ immun gegen eine Malaria-Infektion. Die schützenden Faktoren (wie z.B. maternale Antikörper oder das fetale Hämoglobin) lassen nach drei bis sechs Monaten nach. Im Anschluss daran tragen die Kinder ein sehr hohes Risiko, an einer schweren Malaria zu erkranken. Das Risiko sinkt anschließend wieder während der späten Kindheit und Jugend, bis eine klinische Immunität erreicht ist (Riley, 1999). Vermutlich wird diese Immunität in zwei Stufen aufgebaut. Zuerst werden Mechanismen entwickelt, die die pyrogenen Effekte der Malaria-Toxine neutralisieren (klinische Immunität), bevor schließlich direkte antiparasitäre Mechanismen entstehen (antiparasitäre Immunität). Die klinische Immunität beruht zunächst darauf, dass Antikörper gegen lösliche Malaria-Antigene und Toxine gebildet werden, die die übermäßige Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen

verhindern. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass hohe Titer an anti-GPI-Antikörpern mit der klinischen Immunität gegen Malaria assoziiert sind (Naik et al., 2000). Zudem wird vermutlich die T_H1 -Antwort mit ihrer starken IFN- γ -Produktion zu einer überwiegend anti-inflammatorischen Antwort umgeschaltet. Es wurde beobachtet, dass die Ausbildung der klinischen Immunität mit einer verringerten IFN- γ -Produktion nach Stimulation mit Malaria-Antigen einhergeht (Chizzolini et al., 1990). Im murinen Modell wurde gezeigt, dass die Induktion anti-inflammatorischer Zytokine wie TGF- β mit einer verringerten Pathologie der Malaria assoziiert ist (Omer et al., 1998).

1.2.5 Vakzinierung gegen Malaria

Ein großes Problem bei der Behandlung der Malaria ist die zunehmende Verbreitung von resistenten Plasmodien-Stämmen. Nach Angaben der WHO treten bereits in über 80 Ländern Plasmodien-Stämme auf, die resistent gegen das bedeutendste Malaria-Medikament Chloroquin sind (WHO, 1999). Vor allem im tropischen Afrika überwiegen die resistenten Stämme bei weitem. Dazu kommt das Problem, dass die *Anopheles*-Mücken als Überträger der Plasmodien zunehmend resistent gegen die gebräuchlichsten Insektizide werden. Deshalb ist die Entwicklung eines Impfstoffes ein wichtiges Ziel der Malaria-Forschung. Mit der Entwicklung eines Impfstoffs gegen Malaria sind aber vielfältige Probleme verbunden. Es gibt innerhalb des Leber- und des Blutzyklus verschiedene Ziele für humorale und zelluläre Immunabwehrmechanismen: die freien Sporozoiten, infizierte Hepatozyten, freie Merozoiten und parasitierte Erythrozyten. Aus diesem Grunde existiert eine Vielzahl von Antigenen, gegen die sich eine potenzielle Immunabwehr richten könnte. Diese sind überwiegend hoch polymorph oder treten als antigene Varianten in Multigenfamilien auf. So existieren z.B. etwa 50 variante Kopien des PfEMP-1 (*P. falciparum erythrocyte membrane protein*) im *P. falciparum*-Genom (Smith et al., 1995).

Das Leber-Stadium ist das Ziel vieler Vakzinierungsstrategien, da auf diesem Wege die Entwicklung des erythrozytären Zyklus und der damit assoziierten Pathologie verhindert werden könnte (Übersicht bei Oliveira-Ferreira et al., 2001). Bei Mäusen, Affen und Menschen wurde gezeigt, dass eine Immunisierung mit Sporozoiten, die durch Röntgen- oder γ -Strahlung attenuiert worden waren, eine sterile Immunität gegen eine Plasmodien-Infektion hervorruft (Nussenzweig et al., 1967 und 1970, Clyde et al., 1973). Die Induktion dieser Immunität ist von der Fähigkeit der Sporozoiten abhängig, Hepatozyten

zu infizieren. Das bedeutet, dass die intrazellulären Parasiten das Hauptziel der Immunantwort gegen das Leber-Stadium sind. Zwar können spezifische Antikörper gegen das Circumsporozoiten-Protein (CSP) *in vitro* die Invasion von Hepatozyten durch *P. falciparum*-Sporozoiten verhindern (Chatterjee et al., 1995). Allerdings liegen *in vivo* die Sporozoiten nur etwa 30 Minuten extrazellulär vor, so dass es unwahrscheinlich ist, dass Antikörper allein einen Schutz gegen eine Sporozoiten-Infektion vermitteln können. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Immunität gegen das präerythrozytäre Stadium nach Immunisierung mit attenuierten Sporozoiten primär von CD8⁺ T-Zellen vermittelt wird. So ist die schützende Immunität nach einer Depletion der CD8⁺ T-Zellen *in vivo* drastisch reduziert (Schofield et al., 1987), und durch den Transfer von murinen CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellklonen kann der Schutz auf nicht-immunisierte Mäuse übertragen werden (Romero et al., 1989). Allerdings scheint dabei nicht die zytotoxische Aktivität entscheidend zu sein, sondern die Produktion von IFN- γ und die Induktion von NO (Schofield et al., 1987, Doolan et al., 1996), da gezeigt wurde, dass der protektive Effekt der CD8⁺ T-Zellen von Perforin und Fas/Fas-Ligand-Interaktion unabhängig ist (Renggli et al., 1997). Die Immunisierung mit attenuierten Sporozoiten scheint also primär CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren, die über IFN- γ - und NO-vermittelte Mechanismen Parasiten eliminieren können.

Viele Vakzinierungsstrategien richten sich gegen das Blutstadium der Malaria, da mit diesem Stadium die Pathologie der Infektion assoziiert ist. Allerdings ist die Entstehung einer Immunantwort gegen den erythrozytären Zyklus weniger gut verstanden als die Immunologie des Leberstadiums. In diesem Stadium scheinen vor allem Antikörper und auch CD4⁺ T-Zellen eine Rolle zu spielen (Übersicht bei Good M.F., 2001).

1.3 *B. pertussis* Adenylatcyclase als Antigenträger

Bordetella pertussis ist ein gram-negatives Bakterium, das die Atemwege befällt und den so genannten Keuchhusten hervorruft. Eines der verschiedenen Toxine, die von *B. pertussis* sezerniert werden, ist die Adenylatcyclase ACT. Dabei handelt es sich um einen essentiellen Virulenzfaktor der Bakterien, der dazu dient, sich der Immunabwehr des Wirtes zu entziehen. ACT hat lytische und zytotoxische Aktivität, induziert Apoptose in Makrophagen, inhibiert deren Phagozytose und interferiert mit chemotaktischen Prozessen (Ladant et al., 1999). Das Molekül ist aus drei funktionellen Domänen aufgebaut, einer N-terminalen katalytischen Domäne, einer porenbildenden und einer

Calcium-bindenden Domäne. Diese wird durch etliche Nonapeptid-Wiederholungen gebildet, die charakteristisch für die Mitglieder der RTX (*repeats in toxin*)-Proteinfamilie sind (Rose et al., 1995).

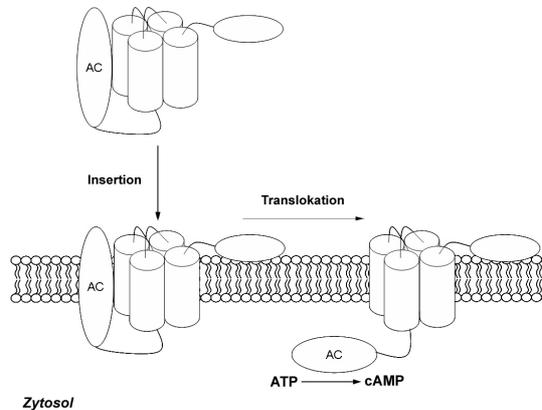


Abb. 1.3) *Bordetella pertussis* Adenylatcyclase (ACT)

Die Adenylatcyclase aus *B. pertussis* besitzt drei funktionelle Domänen. N-terminal befindet sich eine katalytische Domäne, die die Umwandlung von ATP in cAMP katalysiert. Desweiteren besitzt das Molekül eine porenbildende und eine Calcium-bindende Domäne. Nach Insertion der α -helikalen Strukturen der porenbildenden Domäne in die eukaryotische Membran kommt es zur Translokation der katalytischen Domäne (AC) in das Zytosol der Zelle.
(modifiziert nach P. Sebo)

ACT bindet an eukaryotische Zellen und transloziert seine katalytische Domäne ins Zytosol der Wirtszelle, wo sie nach Aktivierung durch endogenes Calmodulin die Bildung von cAMP aus ATP katalysiert (Confer et al., 1982; Ladant et al., 1999). In Abb. 1.3 ist die Translokation schematisch dargestellt. Die Akkumulation von cAMP im Zytosol der Wirtszellen ist ursächlich für die toxische Wirkung des Moleküls (Gray et al., 1998). Obwohl ACT in eine Vielzahl verschiedener eukaryotischer Zellen eindringen kann, findet auch eine spezifische hochaffine Bindung an Zellen, die das $\alpha_M\beta_2$ -Integrin CD11b/CD18 auf der Oberfläche tragen, statt, wie z.B. Makrophagen, Neutrophile, NK-Zellen und dendritische Zellen. Aufgrund dieser Translokation der katalytischen Domäne in das Zytosol eukaryotischer Zellen, speziell CD11b/CD18⁺ antigenpräsentierender Zellen, kann ACT als Antigenträger genutzt werden. Anhand verschiedener ACT-Fusionsmoleküle, die Epitope von Modellantigenen innerhalb der katalytischen Domäne enthielten, wurde gezeigt, dass ACT in der Lage ist, sowohl CD8- als auch CD4-Epitope effizient in den jeweiligen Antigenpräsentationsweg einzuschleusen (Fayolle et al., 1996; Schlecht et al., 2004).

1.4 *Salmonella typhimurium* als Antigeneträger

Salmonellen sind gram-negative, fakultativ intrazelluläre Bakterien. Eine Infektion mit *Salmonella enterica* serovar Typhimurium verursacht beim Menschen eine Gastroenteritis und in der Maus eine Typhus-ähnliche Erkrankung.

Nach der oralen Infektion mit *Salmonella* durchdringen die Bakterien zuerst das gastrointestinale Epithelium, indem sie Enterozyten und die M-Zellen der Peyerschen Plaques infizieren (Jones et al., 1994). Dabei nutzen sie ihre Fähigkeit, in nicht-phagozytierende Zellen einzudringen, indem sie ihre Aufnahme in ein phagosomales Kompartiment induzieren. Zudem lösen die Salmonellen eine lokale Inflammation aus. Für ihre Vermehrung und systemische Ausbreitung nutzen die Salmonellen vor allem Makrophagen. Um dort im Phagosom überleben zu können, müssen sie ihre Wirtszelle modulieren. So findet z.B. keine Fusion des Phagosoms mit Lysosomen statt (Buchmeier et al., 1991). Die für die Invasion und systemische Ausbreitung essentiellen Faktoren sind in den Genclustern SPI1 und SPI2 (*Salmonella pathogenicity islands*) codiert (Galan, 1996; Shea et al., 1996).

1.4.1 Der Typ III – Sekretionsapparat

Der Typ III-Sekretionsapparat ist ein grundlegender Virulenzmechanismus vieler gram-negativer Bakterien wie Salmonellen, Yersinien, Shigellen u.a.. Verwandte Systeme findet man auch in Pflanzenpathogenen. Der Typ III-Sekretionsapparat besteht üblicherweise aus mehr als 20 Proteinen und dient der kontaktabhängigen Translokation von bakteriellen Effektorproteinen in eukaryotische Wirtszellen. Die translozierten bakteriellen Proteine beeinflussen die Signaltransduktion, die Zytokinsynthese, das Zytoskelett und die Membran der infizierten Zellen (Übersicht bei Cornelis et al., 2000).

Salmonellen besitzen zwei unabhängige Typ III-Sekretionsapparate, die in den Genclustern SPI1 und SPI2 codiert sind. Der SPI1-codierte Sekretionsapparat dient der Invasion in eukaryotische Zellen, der SPI2-codierte Sekretionsapparat ist für das Überleben der Bakterien in Makrophagen essentiell (Übersicht bei Hansen-Wester et al., 2001). In Abb. 1.4 ist der SPI1-codierte Typ III-Sekretionsapparat von *S. typhimurium* schematisch dargestellt.

Die Bildung des Typ III-Sekretionsapparats bedarf der koordinierten Expression, Sekretion und Assoziation von mehr als 20 Proteinen (Übersicht bei Kimbrough et al., 2002). Etwa zehn verschiedene Membranproteine bilden einen zylindrischen

Kernkomplex, der die innere und äußere bakterielle Membran durchspannt. Durch diesen Komplex werden weitere Proteine exportiert, die den so genannten *needle complex* bilden, der 60 bis 80 nm lang und elektronenmikroskopisch sichtbar ist (Kubori et al., 1998). Schließlich vervollständigt der Export der Translocon-Proteine, die mit der eukaryotischen Membran assoziieren können, den Sekretionsapparat.

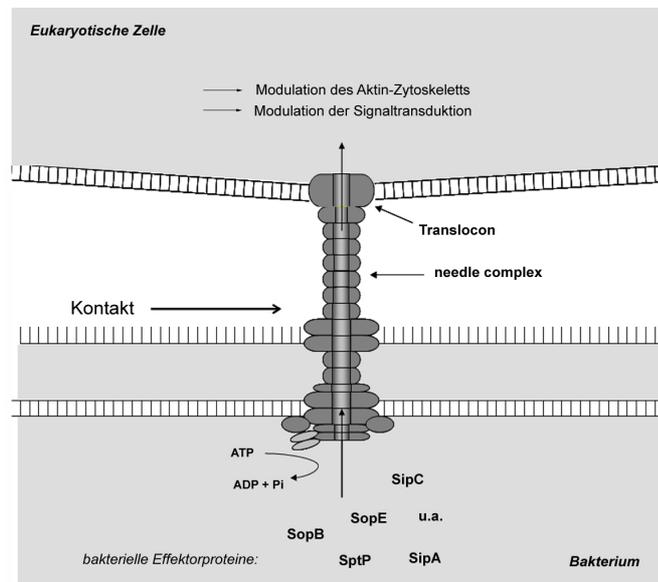


Abb. 1.4) Der Typ III – Sekretionsapparat von *Salmonella typhimurium*

Der im Gencluster SPI1 codierte Typ III-Sekretionsapparat von *S. typhimurium* dient der kontaktabhängigen Translokation von bakteriellen Effektorproteinen in das Zytosol eukaryotischer Wirtszellen. Er besteht aus über 20 Proteinen. Der Kernkomplex, der die innere und äußere Membran durchspannt, verankert den so genannten *needle complex* in der bakteriellen Membran. Die Proteine des Translocons assoziieren schließlich mit der eukaryotischen Membran. Durch den Sekretionsapparat werden verschiedene Effektorproteine transloziert, die hauptsächlich das Aktin-Zytoskelett und die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflussen.

Die translozierten Effektorproteine lassen sich überwiegend in zwei Gruppen unterteilen (Übersicht bei Cornelis et al., 2000). Zu den Proteinen, die das Aktin-Zytoskelett modulieren, gehören u.a. die Aktin-bindenden Proteine SipA und C, die die Macropinozytose und damit die Aufnahme der Salmonellen in nicht-phagozytierende Zellen induzieren. Der Nukleotidaustauschfaktor SopE und der GTPase-Aktivator SptP beeinflussen ebenfalls das Aktin-Zytoskelett über die kleinen G-Proteine Rac-1 und Cdc42. Andere Effektorproteine, wie z.B. SipB, modulieren hingegen die Signaltransduktion in der Wirtszelle, was zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und IL-8 oder Induktion der Apoptose in Makrophagen führt.

Alle Typ III-Effektorproteine besitzen ein N-terminales Sekretionssignal, das ihre Sekretion und Translokation in die eukaryotische Zelle vermittelt, allerdings gibt es keine einheitliche, klassische Signalsequenz. Die meisten Effektorproteine sind mit spezifischen Chaperonen assoziiert, deren Funktion sowohl die Stabilisierung des Proteins als auch die Steuerung der Translokation beinhaltet.

1.4.2 Einsatz von *S. typhimurium* SB824 als Antigenträger

Der Typ III-Sekretionsapparat kann genutzt werden, um Antigene in das Zytosol eukaryotischer Zellen zu translozieren und MHC I-restringierte T-Zellantworten zu induzieren. Der Einsatz des Typ III-Sekretionsapparats von *S. typhimurium* als Antigentransporter wurde bereits beschrieben. Dabei wurden Salmonellen konstruiert, die ein Fusionsmolekül aus dem Effektorprotein SptP und einem Influenza-Epitop exprimierten und so eine spezifische CTL-Antwort induzierten (Rüssmann et al., 1998). Der Typ III-Sekretionsapparat von *Yersinia enterocolitica* wurde ebenfalls als Antigentransporter genutzt, indem heterologe Antigene als Fusionsmolekül mit dem Effektormolekül YopE exprimiert wurden (Chaux et al., 1999). YopE ist eines der am besten charakterisierten Typ III-Effektorproteine, dessen Signalsequenzen für die Sekretion bzw. Translokation bekannt sind. Die minimale Sequenz für Sekretion und Translokation von YopE ist N-terminal lokalisiert und wurde auf die ersten 50 Aminosäuren eingegrenzt (Sory et al., 1995), so dass sich aus der Translokations-Domäne von YopE und beliebigen Antigenen Fusionsproteine konstruieren lassen. Aufgrund der großen Homologie der Typ III-Sekretionsapparate von Yersinien und Salmonellen kann das Yersinien-Protein YopE auch von Salmonellen in eukaryotische Zellen transloziert werden (Rosquist et al., 1995). Die Verwendung von YopE als Träger-Molekül für die Typ III-abhängige Translokation von heterologen CD8⁺ T-Zell-Antigenen durch Salmonellen führt zur Induktion spezifischer CTL-Antworten in immunisierten Mäusen (Rüssmann et al., 2001; Igwe et al., 2002).

Es stehen verschiedene attenuierte Salmonellen-Stämme zur Verfügung, die für Vakzinierungen genutzt werden können. Der hier verwendete Stamm *S. typhimurium* SB824 ist eine *aroA*-Mutante (Rüssmann et al., 1998). Aufgrund eines fehlenden Enzyms sind diese Salmonellen auxotroph für die aromatischen Verbindungen p-Aminobenzoat und 2,3-Dihydroxybenzoat. Da diese Verbindungen im Gewebe von Säugern nicht vorkommen, sind die Salmonellen in ihrer Fähigkeit, im Gewebe zu persistieren, stark beeinträchtigt.

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Durch Immunisierungen mit attenuierten Sporozoiten wurde gezeigt, dass eine zelluläre Immunantwort gegen das Haupt-Oberflächenprotein der Sporozoiten, das Circumsporozoiten-Protein (CSP), einen Schutz gegen eine Malaria-Infektion vermittelt (Schofield et al., 1987; Romero et al., 1989). Um eine zelluläre Immunantwort zu induzieren, ist es erforderlich, das Antigen in das zytosolische Kompartiment von APZ zu transportieren, damit es auf MHC I-Molekülen präsentiert werden kann. Mit Hilfe verschiedener Strategien wie DNA-Vakzinierung oder dem Einsatz viraler Antigenträger wurde versucht, eine solche CSP-spezifische Immunantwort zu erzeugen, jedoch war die Effizienz dieser Immunisierungen im Allgemeinen nicht ausreichend. Als Erfolg versprechend haben sich vor allem heterologe *prime/boost*-Immunisierungen erwiesen, d.h. Immunisierungen, bei denen mit verschiedenen Antigenträgersystemen gegen dasselbe Antigen immunisiert wird (Schneider et al., 1998; Gilbert et al., 2002).

In dieser Arbeit sollte am Modell der *Plasmodium berghei*-Infektion die Effizienz zweier neuer Antigenträger untersucht werden. Zum einen sollten rekombinante Salmonellen als bakterielle Antigenträger hergestellt werden, die das CD8-Epitop von CSP über ihren Typ III-Sekretionsapparat in das MHC I-Kompartiment einschleusen. Zum anderen sollte die Adenylatcyclase (ACT) von *B. pertussis* als Träger für das CSP-Epitop genutzt werden.

Im Rahmen der Arbeit sollten beide Antigenträgersysteme *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden. Zunächst sollte *in vitro* nachgewiesen werden, ob es zu einer Translokation des Antigens in eukaryotische Zellen und zur Präsentation auf MHC I-Molekülen kommt. Desweiteren sollten Mäuse immunisiert werden, um zu untersuchen, ob sich mit beiden Antigenträgern eine CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort induzieren lässt, ob die CSP-spezifischen T-Zellen auch in der Leber, dem Zielorgan der Sporozoiten, aktiv sind, ob beide Systeme Memory-T-Zellen erzeugen und nicht zuletzt, ob die induzierte Immunantwort protektiv wirkt.

2 Material

2.1 Herkunft häufig verwendeter Reagenzien und Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka (Neu Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.1.2 Plastikwaren

Elektroporationsküvetten 1mm	<i>Peqlab, Erlangen</i>
Eppendorf-Reaktionsgefäße	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
FACS-Röhrchen	<i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
Falcon-Röhrchen	<i>Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg</i>
Gewebekulturflaschen, 10 ml, 30 ml	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
Gewebekulturplatten, 6, 24 und 96 well	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
Kryoröhrchen	<i>Nunc, Roskilde, Dänemark</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt, Nürnberg</i>
	<i>Gilson, Villiers-le-bel, Frankreich</i>
Plastikküvetten für Photometer	<i>Brandt, Wertheim</i>
Spritzen und Kanülen	<i>Braun, Melsungen</i>
Sterilfilter, 0,22 µm und 0,45 µm	<i>Schleicher&Schuell, Dassel</i>
Sterilfiltriergefäße „SteriCup“	<i>Millipore, Bedford, MA., USA</i>
Zellsiebe Cell strainer 70 µm	<i>Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg</i>

2.1.3 Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Agarose	<i>Biomol, Hamburg</i>
Ampicillin	<i>Boehringer, Mannheim</i>
Bacto-Agar	<i>Merck, Darmstadt</i>
Bacto-Trypton	<i>Difco, Detroit, MI, USA</i>
Big Dye Sequenziermix	<i>Applied Biosystems, Foster City, CA</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Desoxyribonukleosidtriphosphate	<i>MBI Fermentas, St.Leon-Rot</i>
DNA-Marker (100bp-Leiter, 1kb-Leiter)	<i>MBI Fermentas, St.Leon-Rot</i>
Ethidiumbromid	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Hefeextrakt	<i>Difco, Detroit, MI, USA</i>
Kanamycin	<i>Boehringer, Mannheim</i>
Mineralöl	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Plasmid-Minipräparations-Kit	<i>Macherey&Nagel, Düren</i>
Plasmid-Midipräparations-Kit	<i>QIAGEN, Hilden</i>
QIAEX II-DNA-Gelextraktions-Kit	<i>QIAGEN, Hilden</i>
TA Cloning [®] Kit	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Xylencyanol	<i>Serva Feinbiochemika, Heidelberg</i>

2.1.4 Reagenzien für biochemische Arbeiten

Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Bovines Serumalbumin (BSA)	<i>Serva Feinbiochemika, Heidelberg</i>
Dithiothreitol (DTT)	<i>GibcoBRL, Eggenstein</i>
ECL Western Blotting Detection Reagents	<i>Amersham, Buckinghamshire, UK</i>
Hybond Nitrocellulose Membran	<i>Amersham, Buckinghamshire, UK</i>
Hyperfilm	<i>Amersham, Buckinghamshire, UK</i>
Milchpulver	<i>Nestlé, Frankfurt</i>
PD10-Säulen	<i>Amersham, Buckinghamshire, UK</i>
Protein-Marker (10 kD-Leiter, Benchmark™ Prestained MW-Marker)	<i>GibcoBRL, Eggenstein</i>
Tween-20	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Whatman-Filterpapier	<i>Schleicher&Schuell, Dassel</i>

2.1.5 Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

Avidin-HRP	<i>BD Pharmingen, Heidelberg</i>
CohnII (humane IgG-Fraktion)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Diaminobenzidin (DAB)	<i>BioRad, München</i>
Fetales Kälberserum (FCS)	<i>GibcoBRL, Eggenstein</i>
Gentamycin	<i>GibcoBRL, Eggenstein</i>
L-Glutamin (200 mM)	<i>GibcoBRL, Eggenstein</i>
³ H-Thymidin	<i>Amersham Buckinghamshire, UK</i>
NycoPrep™ Universal	<i>Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway</i>
RPMI 1640	<i>GibcoBRL, Eggenstein</i>
Szintillationsflüssigkeit für β-Counter (Rotiscint)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Triton X-100	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Trypsin 0,25%	<i>GibcoBRL, Eggenstein</i>
Trypanblau	<i>Serva Feinbiochemika, Hamburg</i>

2.2 Enzyme

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase, 1 U/μl	<i>MBI Fermentas, St.Leon-Rot</i>
T ₄ -DNA-Ligase, 5 U/μl	<i>MBI Fermentas, St.Leon-Rot</i>

Restriktionsendonukleasen:

<i>Bam</i> HI, 10 U/μl	<i>MBI Fermentas, St.Leon-Rot</i>
<i>Eco</i> RI, 10 U/μl	<i>MBI Fermentas, St.Leon-Rot</i>
<i>Sal</i> I, 10 U/μl	<i>MBI Fermentas, St.Leon-Rot</i>
<i>Xho</i> I, 10 U/μl	<i>MBI Fermentas, St.Leon-Rot</i>

2.3 Plasmidvektoren

pCR® 2.1 (TA Cloning® Kit)	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
pSG-pbCSP	wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Sarah Gilbert, Oxford, UK
pHR319	wurde zur Verfügung gestellt von Dr. H. Rüssmann, Max- von Pettenkofer-Institut, München

2.4 Oligonukleotid-Primer

<u>s-CSP I-BamHI</u> 5'-GCGGGATCCCCACAGCCAGGTGGTAATAAC-3'	<i>MWG BiotechAG, Ebersberg</i>
<u>as-CSP I-XhoI/SalI</u> 5'-CGCGTCGACCTCGAGGATCTGTTTAAACAAATTCTAG-3'	<i>MWG BiotechAG, Ebersberg</i>
<u>s-YopE-SacII</u> 5'-CACCCGCGGCAGACCATCAATTTG-3'	<i>MWG BiotechAG, Ebersberg</i>
<u>M13-Forward-Primer</u> 5'-CTGGCCGTCGTTTTAC-3'	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
<u>M13-Reverse-Primer</u> 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>

2.5 Antikörper

Hamster anti-Maus CTLA-4 (4F10) Hybridom UC10-4F10 wurde zur Verfügung gestellt von J. Bluestone, University of Chicago, USA

Immunfluoreszenz und Western Blot:

Maus anti-M45 wurde zur Verfügung gestellt von Dr. H. Rüssmann, Max von Pettenkofer-Institut, München
DADE Behring

Kaninchen anti-Salmonella O-4,5 (Gruppe B) Testserum

Kaninchen anti-Maus Ig, HRP-konjugiert *DAKO A/S, Dänemark*
Kaninchen anti-Maus IgG, FITC-markiert *DAKO A/S, Dänemark*
Ziege anti-Kaninchen IgG, TRITC-markiert *Caltag, Burlingame, CA, USA*

ELISPOT:

anti-IFN γ ELISPOT Paar *BD Pharmingen, Heidelberg*

2.6 Peptide

CSP ₂₄₅₋₂₅₃	SYIPSAEKI	<i>MWG BiotechAG, Ebersberg</i>
CSP ₅₇₋₇₀	KIYNRNTVNRLAD	<i>MWG BiotechAG, Ebersberg</i>
OVA ₂₅₇₋₂₆₄	SIINFEKL	<i>MWG BiotechAG, Ebersberg</i>

2.7 Kulturmedien

2.7.1 Medien für Bakterien

<u>LB-Medium</u>	5 g Hefextrakt 10 g Bacto-Trypton 10 g NaCl	ad 1 Liter H ₂ O, pH 7,5
<u>LB-Agar</u>	15 g Bacto-Agar	ad 1 Liter LB-Medium

Nach dem Autoklavieren wurde der LB-Agar auf etwa 42°C abgekühlt, bevor Antibiotika zugegeben wurden. Dann wurden je etwa 20 ml Agar in eine Petrischale gegossen. Die Platten wurden einige Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und dann bei 4°C aufbewahrt.

Antibiotika:

LB-Medien und LB-Agarplatten wurden zur Selektion auf Antibiotikaresistenzen mit Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml oder mit Kanamycin in einer Konzentration von 50 µg/ml versetzt.

2.7.2 Medien für eukaryotische Zellen

Fetales Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung des Komplementsystems vor Gebrauch für 30 Minuten auf 56°C erhitzt.

<u>RPMI 1640 mit 10% FCS</u>	500 ml RPMI 1640 50 ml FCS 5 ml L-Glutamin (200 mM) 2,5 ml Gentamycin
------------------------------	--

<u>Einfriermedium</u>	50% FCS 40% RPMI mit 5% FCS 10% DMSO
-----------------------	--

2.8 Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und für zelluläre Arbeiten vor Gebrauch sterilfiltriert oder autoklaviert.

2.8.1 Puffer und Stammlösungen für molekularbiologische Arbeiten

<u>Ampicillin-Stammlösung</u>	50 mg/ml	in Aqua dest.
<u>6x DNA-Ladepuffer</u>	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 15% Ficoll	
<u>dNTP-Mix für PCR</u>	2 mM dATP 2 mM dCTP 2 mM dGTP 2 mM dTTP	

<u>Ethidiumbromid-Lösung</u>	10 mg/ml	
<u>Kanamycin-Stammlösung</u>	25 mg/ml	
<u>Natriumacetat-Lösung</u>	3M Natriumacetat pH4,6	
<u>50x TAE-Puffer</u>	0,6 M Natriumacetat 2 M Tris Base 0,1 M Na ₂ EDTA	pH 8,3
<u>10x TBE-Puffer</u>	0,89 M Tris Base 0,89 M Borsäure 20 mM Na ₂ EDTAx2H ₂ O	pH 8,0

2.8.2 Puffer und Stammlösungen für biochemische Arbeiten

<u>5x Beladungspuffer (SDS-PAGE)</u>	50 mM Tris 2% SDS 5% Glycerin 10% 1M DTT wenig Bromphenolblau	pH 6,8
<u>Blockpuffer (ELISPOT)</u>	1% BSA in PBS	
<u>Blockpuffer (Western Blot)</u>	4% Magermilchpulver in PBS-Tween	
<u>10x CAPS-Puffer (Western Blot)</u>	22,13 g CAPS in 1000 ml Aqua dest.	pH 11,0
<u>1x CAPS-Puffer (Western Blot)</u>	100 ml 10x CAPS 100 ml Methanol Ad 1000 ml Aqua dest.	
<u>Coating-Puffer (ELISPOT)</u>	0,1M NaHCO ₃	pH 9,4
<u>Coomassie-Färbelösung</u>	2 g Coomassie Brilliant Blue R 250 500 ml 95% Methanol 100 ml Eisessig ad 1000 ml Aqua dest.	
<u>Diaminobenzidin-Stammlösung DAB (ELISPOT)</u>	40 mg/ml DAB in Aqua dest.	
<u>Entwickler (Silberfärbung)</u>	15 g Na ₂ CO ₃ 250 ml Aqua dest. 12,5 µl Na ₂ S ₂ O ₃ -Lösung 125 µl 37% Formaldehyd	
<u>Fixierer (Silberfärbung)</u>	100 ml Methanol 24 ml Eisessig 76 ml Aqua dest.	
<u>Imprägnierlösung (Silberfärbung)</u>	300 mg AgNO ₃ 150 ml Aqua dest. 112 µl 37% Formaldehyd	

<u>10x Laufpuffer (SDS-PAGE)</u>	250 mM Tris 2,5 M Glycin 1% SDS	
<u>Natriumthiosulfat-Stocklösung (Silberfärbung)</u>	430 mg Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O 5 ml Aqua dest.	
<u>Nickelchlorid-Stammlösung (ELISPOT)</u>	80 mg/ml NiCl ₂ in Aqua dest.	
<u>20x PBS</u>	2,7 M NaCl 54 mM KCl 87 mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 30 mM KH ₂ PO ₄	pH 7,4
<u>PBS-Tween (Western Blot)</u>	0,1% Tween 20 in 1xPBS	
<u>5%iges Sammelgel (SDS-PAGE)</u>	1,25 ml 4x Sammelgelpuffer 0,8 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 3 ml Aqua dest. 50 µl 10% APS 12,5 µl TEMED	
<u>4x Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)</u>	0,5 M Tris 0,4% SDS	pH 6,8
<u>Sensibilisierungspuffer (Silberfärbung)</u>	300 µl Na ₂ S ₂ O ₃ -Lösung 200 ml Aqua dest.	
<u>Substratlösung (ELISPOT)</u>	200 µl DAB 50 µl NiCl 2,5 µl H ₂ O ₂ 10 ml Substratpuffer	
<u>Substratpuffer (ELISPOT)</u>	100 mM Tris	pH 7,0
<u>12,5%iges Trenngel (SDS-PAGE)</u>	2,5 ml 4x Trenngelpuffer 4 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 3,5 ml Aqua dest. 100 µl 10% APS 12,5 µl TEMED	
<u>4x Trenngelpuffer (SDS-PAGE)</u>	1,5 M Tris 0,4% SDS	pH 8,8
<u>Waschpuffer (Silberfärbung)</u>	50% Ethanol in Aqua dest.	

2.8.3 Puffer und Stammlösungen für zellbiologische Arbeiten

<u>CohnII-Lösung</u>	10 mg/ml in PBS	
<u>Erythrozytenlyse-Puffer</u>	10% 0,1 M Tris/HCl 90% 0,158 M NH ₄ Cl	pH 7,5
<u>Nycodenz-Lösung</u>	30% Nycoprep™ in Aqua dest.	

<u>Trypanblau-Lösung</u>	2 mg/100 ml	in PBS
<u>FACS-Puffer</u>	1x PBS 5% FCS 0,01% NaN ₃	
<u>FACS-Fixierer</u>	4% Paraformaldehyd in PBS	

2.9 Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere

Bakterienstämme:

<i>E. coli</i> DH5 α F		<i>New England Biolabs, Bad Schwalbach</i>
<i>S. typhimurium</i> SB824 (Δ <i>aroA</i> ; <i>sptp::kan</i>)		wurde zur Verfügung gestellt von Dr. H. Rüssmann, Max von Pettenkofer-Institut, München

Eukaryotische Zelllinien:

P388D ₁	Ursprung: DBA/2-Maus, H2-K ^d , aus lymphoider Neoplasie, Makrophagen-ähnlich	<i>BNI Hamburg</i>
--------------------	---	--------------------

Mäuse:

BALB/c-Mäuse	Haplotyp H2-K ^d	<i>BNI Hamburg; Bundesanstalt für Risikobewertung</i>
C57Bl/6-Mäuse	Haplotyp H2-K ^b	<i>BNI Hamburg</i>
OT-1-Mäuse	Haplotyp H2-K ^b ; alle CD8 ⁺ T-Zellen tragen einen transgenen TCR für das OVA-Epitop SIINFEKL	<i>BNI Hamburg</i>

Sporozysten:

<i>P. berghei</i> ANKA		wurden zur Verfügung gestellt von Dr. V. Heussler, BNI Hamburg
------------------------	--	---

2.10 Laborgeräte

Analysenwaage	<i>Sartorius AG, Göttingen</i>
Bakterienbrutschrank	<i>Heraeus, Hanau</i>
Blotkammer	<i>BioRad, München</i>
CO ₂ -Inkubator für die Zellkultur	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Digitalwaage	<i>Kern&Söhne, Alberstadt</i>
Elektroporationsgerät „Gene Pulser“	<i>BioRad, München</i>
ELISPOT-Reader	<i>BioSys, Karben-Frankfurt</i>
Eppendorfszentrifuge 5415C	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
FACS-Gerät „FACSCalibur“	<i>Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA</i>
FACS-Software CELLQuest 3.0	<i>Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA</i>
Filmkassette	<i>Siemens, München</i>
Filmentwickler Curix6	<i>AGFA</i>
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2plus mit digitaler Kameraanlage	<i>Mikroskop: Zeiss Kamera: Hamamatsu</i>

Gelkammer (DNA-Gelelektrophorese)	<i>Software: Openlab, Improvision, Coventry, UK</i>
Gelkammer (Protein-Gelelektrophorese)	<i>BioRad, München</i>
Heizblock Thermomixer 5436	<i>BioRad, München</i>
Magnetrührer	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Megafuge 1.0R	<i>Jahnke&Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen</i>
Mehrkanalpipette „Research Pro“	<i>Heraeus Sepatech, Hanau</i>
Mikroskop	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Mikrowelle	<i>Nikon TMS</i>
Netzteil (DNA-Gelelektrophorese)	<i>Panasonic</i>
Netzteil (Protein-Gelelektrophorese)	<i>BioRad, München</i>
Neubauer-Zählkammer (0,1 x 0,0025 mm ²)	<i>Biotech-Fischer, Reiskirchen</i>
PCR-Cycler	<i>Brandt, Wertheim</i>
pH-Meter	<i>Hybaid Ltd., Middlesex, UK</i>
Photoanlage für DNA-Gele	<i>Laborotec, Wiesbaden</i>
Photometer „Hitachi U-2000“	<i>Mitsubishi, Tokio, Japan</i>
	<i>Schäfer&Partner Scientific instruments,</i>
	<i>Schwäbisch-Gmünd</i>
Pipetten	<i>Gilson Medical Electronics, Frankreich</i>
	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Pipettierhilfe	<i>Hirschmann</i>
Schüttelinkubator	<i>Infors, Bottmingen, Schweiz</i>
Spektrophotometer U-2000	<i>Hitachi, Japan</i>
Sterile Arbeitsbank Laminair HB2448	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
β-Szintillationszähler 1205 Betaplate	<i>Wallac, Turku, Finnland</i>
Ultrazentrifuge	<i>Beckmann, Palo Alto, USA</i>
UV-Tisch	<i>Int. Biotechnologies, New Haven, CT, USA</i>
Vortexer	<i>Jahnke&Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen</i>
Wasserbad	<i>Haake, Karlsruhe</i>
Wasserdeionierungsanlage Milli-Q-Plus	<i>Millipore, Molsheim, Frankreich</i>
Zellerntegerät Microcell Harvester	<i>Scatron Instruments, Lier, Norwegen</i>

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen Methoden sind, soweit nicht anders angegeben, im folgenden Laborhandbuch beschrieben:

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbour Press, New York

3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) dient der enzymatischen Amplifikation von DNA *in vitro* (Saiki et al., 1988). Dabei wird die Eigenschaft thermostabiler DNA-Polymerasen, z.B. aus *Thermophilus aquaticus*, genutzt, Temperaturen von 95°C zu überstehen und DNA bei 72°C optimal zu synthetisieren. Eine Matrizen-DNA (Template) wird bei 95°C denaturiert, an die Einzelstränge lagern sich dann bei einer niedrigeren Temperatur zwei komplementäre Primer an (Annealing). Bei 72°C wird ausgehend von den Primern in 5'→3' Richtung der komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Das zwischen den Primern liegende DNA-Fragment wird so in jedem Zyklus vervielfältigt, und seine Konzentration steigt exponentiell an. Dadurch können selbst geringe DNA-Mengen spezifisch amplifiziert werden.

Die PCR-Reaktionen wurden in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

<u>Ansatz:</u>		<u>Programm:</u>				
Template-DNA	100 ng	1x	5 min	94°C	Denaturierung	
10x Reaktionspuffer	2,5 µl					
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl		30 sec	94°C	Denaturierung	
dNTP-Mix (2 mM)	2,5 µl	30x	30 sec	58°C	Annealing	
sense Primer (10 µM)	2,0 µl		1 min	72°C	Amplifikation	
antisense Primer (10 µM)	2,0 µl					
<i>Taq</i> -Polymerase (1U/µl)	0,5 µl	1x	5 min	72°C	Amplifikation	
Gesamtvolumen	25,0 µl					

Bei der Auswahl der Primer muß darauf geachtet werden, daß diese keine zueinander komplementären oder repetitiven Sequenzen enthalten, um die Ausbildung von Primer-Oligomeren oder unspezifisches Primer-Annealing zu verhindern. Außerdem sollten die zusammen verwendeten Primer eine ähnliche Schmelztemperatur (Annealing-Temperatur) besitzen. Diese wurde mit folgender Formel näherungsweise bestimmt:

$$T_m = 2N(A+T) + 4N(G+C) \quad N: \text{Anzahl der Basen}$$

Die verwendete Taq-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* besitzt keine 3'→5' Exonukleaseaktivität, hat also keine Möglichkeit zur Fehlerkorrektur. Falsche Nukleotide werden mit einer statistischen Häufigkeit von 2×10^{-4} eingebaut.

3.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Die DNA-Moleküle wandern dabei in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphorsäurediestergruppen zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearen DNA-Molekülen im Agarosegel ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare.

Die Konzentration des Agarosegels ist abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Hier wurden 1-2%ige Gele verwendet. Für analytische Gele wurde 1xTBE, für präparative Gele 1xTAE als Puffer eingesetzt.

Die Detektion der DNA erfolgte mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid, der den Gelen in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugesetzt wurde. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Als Größenstandards wurden die DNA-Molekulargewichtsmarker „100bp-Leiter plus“ oder „1kb-Leiter“ verwendet. Es wurde jeweils 1 µg DNA-Marker eingesetzt.

3.1.3 Isolierung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente spezifisch aufzureinigen, wurde die DNA in präparativem Maßstab auf einem Agarosegel aufgetrennt und das gesuchte Fragment anschließend aus dem Gel unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus der Agarose wurde nach dem „QIAEX II Gel Extraction Kit Protocol“ (QIAGEN GmbH, Hilden) durchgeführt.

3.1.4 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen hydrolytisch spalten. Entsprechend der Lage der Schnittstellen entstehen dabei DNA-Fragmente einer bestimmten Länge und mit definierten Enden.

Die Restriktionsverdau wurden nach Herstellerangaben angesetzt und durchgeführt. Für analytische Restriktionen wurden etwa 0,5 – 1 µg, für präparative Restriktionen etwa 4 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Pro 1 µg DNA wurden 2U Enzym zugegeben.

3.1.5 Ligation

Mit Hilfe von Ligasen können DNA-Fragmente miteinander verknüpft werden. Die hier verwendete T₄-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxylgruppe in doppelsträngiger DNA. Die T₄-Ligase verbindet sowohl stumpfe als auch überhängende Enden.

3.1.5.1 Klonierung von PCR-Produkten in pCR[®]2.1 (TA Cloning[®] Kit)

Der pCR[®]2.1-Vektor ist ein von pBluescript abgeleiteter Plasmidvektor. Er liegt linearisiert mit überhängenden Thymidingruppen an den 3'-Enden vor. Die Klonierungsstrategie beruht auf der matrizenunabhängigen Terminale-Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase, welche PCR-Produkte mit überhängenden Adeningruppen an den 3'-Enden erzeugt. Auf diese Weise können PCR-Produkte direkt mit dem pCR[®]2.1-Vektor ligiert werden. Der pCR[®]2.1-Vektor erlaubt zudem eine Blau-Weiß-Selektion auf positive Kolonien, da die Klonierungsstelle im *lacZ*-Gen liegt.

Die Durchführung der Ligation erfolgte nach den Herstellerangaben (Invitrogen, Karlsruhe). Die Ligationsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

PCR-Produkt	7 µl
pCR [®] 2.1-Vektor (25 ng/µl)	1 µl
10x T ₄ -Ligase-Puffer	1 µl
T ₄ -Ligase (4U/µl)	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Der pCR[®]2.1-Vektor wurde als Zwischenvektor für die Analyse von PCR-Produkten durch Sequenzierung eingesetzt. Zu diesem Zweck sind die M13-Forward- und

M13-Reverse-Primer erhältlich, die an Vektorsequenzen hybridisieren, die die integrierte DNA flankieren.

3.1.5.2 Klonierung in den Expressionsvektor pHR319

Der Vektor pHR319 ist ein Derivat des *low copy* Plasmids pWSK29 (Dr. H. Rüssmann, Max von Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München). Er codiert das YopE-spezifische Chaperon SycE sowie die Sequenz für das adenovirale Peptid M45, welches dem Nachweis des Fusionsmoleküls im Western Blot und in der Immunfluoreszenz dient. Zudem trägt das Plasmid den *lacZ*-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen.

Die Ligationsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Vektor-DNA	0,5 µg
Insert-DNA	1,0 - 1,5 µg
10x T ₄ -Ligase -Puffer	1,0 µl
T ₄ -Ligase (5U/µl)	1,0 µl
Gesamtvolumen	10,0 µl

Bei jeder Ligation wurde eine Negativkontrolle mit Wasser anstelle der Insert-DNA durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden im Anschluß direkt für die Transformation von *E. coli* DH5 α F eingesetzt.

3.1.6 Transformation von kompetenten Bakterien

3.1.6.1 Transformation von *E. coli* DH5 α F

Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983). Kompetente Bakterien wurden mit Hilfe der Calciumchlorid-Methode hergestellt und bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

Für eine Transformation wurden entweder 100 ng Vektor-DNA oder ein vollständiger Ligationsansatz eingesetzt. Die DNA wurde auf Eis zu 50 µl kompetenten Bakterien gegeben. Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C unterzogen und anschließend weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde 1 ml LB-Medium zugegeben, und die Bakterien wurden bei 37°C und 220 rpm für eine Stunde geschüttelt. Schließlich wurden die Ansätze auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.6.2 Elektroporation von *S. typhimurium* SB824

Der Salmonellen-Stamm SB824 wurde mit Hilfe der Elektroporation mit dem Expressionsvektor pST-TB transformiert. Dafür wurde eine Übernachtskultur der Bakterien in frisches LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin überimpft und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,6$ wachsen gelassen. Dann wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt und 15 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in eiskaltem Aqua dest. und einmal in 10% Glycerin gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl 10% Glycerin aufgenommen. 40 µl der Bakteriensuspension wurden mit 100 ng Plasmid-DNA gemischt und in eine 1 mm-Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV, 200 Ω und 25 µF. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium bei 37°C für 30 Min inkubiert und dann auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

3.1.6.3 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion ermöglicht die schnelle Identifikation von transformierten Bakterien, die einen Vektor mit Insert enthalten. Hierfür wurden die LB-Ampicillin-Platten vor der Transformation mit je 100 µl X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactosid) bestrichen. X-Gal ist ein Substrat der β-Galactosidase und wird zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Trägt ein Vektor mit dem *lacZ*-Gen ein Insert, welches die *lacZ*-Gensequenz unterbricht, wird keine β-Galactosidase gebildet und die Kolonien der transformierten Bakterien bleiben weiß.

3.1.6.4 PCR-Screening von transformierten Bakterien

Zur Selektion von Bakterien, die einen Vektor mit integriertem Insert trugen, diente neben der Blau-Weiß-Selektion die PCR-Amplifikation der in den Vektor integrierten DNA.

Hierfür wurden mit Pipettenspitzen von den LB-Platten mit den transformierten Bakterien Klone gepickt. Die Spitzen wurden in je 100 µl Aqua dest. für 5 Minuten bei 95°C inkubiert, um die anhaftenden Bakterien zu lysieren und Plasmid-DNA freizusetzen. Ein Aliquot davon wurde für eine PCR eingesetzt. Es wurden diejenigen Primer, die zuvor für die PCR-Amplifikation verwendet worden waren, mit den gleichen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Es wurde stets eine Negativkontrolle mit Wasser anstelle der Template-DNA durchgeführt, um Verunreinigungen der Reagenzien auszuschließen.

Die Ansätze sahen wie folgt aus:

Bakterienlysate	2,0 µl
sense-Primer (10 pmol/µl)	2,0 µl
antisense-Primer (10 pmol/µl)	2,0 µl
10xReaktionspuffer	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (2 mM)	2,5 µl
Taq-Polymerase (1U/µl)	0,5 µl
Gesamtvolumen	25,0 µl

Im Anschluß wurden die PCR-Ansätze in einem Agarosegel analysiert.

3.1.7 Plasmidpräparation aus Bakterien

Für Plasmidpräparationen wurden transformierte Bakterien in LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C im Schüttler angezogen. Für Minipräparationen wurden 5 ml Kultur angeimpft, für Midipräparationen 100 ml. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt mit Hilfe des Plasmid-Minipräparations-Kits von Macherey&Nagel (Düren) bzw. des Plasmid-Midipräparations-Kits von QIAGEN (Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Aufreinigungsmethode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien und der anschließenden Adsorption der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Matrix.

3.1.8 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte photometrisch und beruht auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Absorptionswert von 1,0 bei einer Küvettschichtdicke von 1 cm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

3.1.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Didesoxymethode (Sanger et al., 1975) mit einem Sequenzierungskit (BigDye-Sequenziermix; PRISM Ready Reaction Dyedeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Durch Verwendung von vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen für die Markierung der vier Didesoxynukleotide kann die enzymatische Reaktion in einem

Ansatz durchgeführt werden. Der verwendete BigDye-Sequenziermix enthält neben der FF-*Taq*-Polymerase und dem entsprechenden Reaktionspuffer die vier dNTPs und deren Didesoxynukleotid-Analoga.

Tabelle 3.1: *Fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide*

Die Tabelle zeigt die zur Markierung der Didesoxynukleotide verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Didesoxynukleotid	Fluoreszenzmarkierung
ddATP	5-Carboxyrhodamin
ddCTP	6-Carboxyrhodamin X
ddGTP	5-Carboxyrhodamin 110
ddTTP	6-Carboxytetramethylrhodamin

Zur Sequenzierung der PCR-Produkte wurden die M13-Forward- und M13-Reverse-Primer verwendet, die an Vektorsequenzen im pCR[®]2.1-Vektor binden. In einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß wurden 1 µg DNA und 15 pmol Primer mit Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 4 µl BigDye-Sequenziermix wurde der Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um Verdunstungsverluste zu verhindern.

Im Thermocycler wurden 25 Zyklen des folgenden Programms durchlaufen:

10 sec	96°C	Denaturierung
5 sec	50°C	Annealing
4 min	60°C	Amplifikation

Anschließend wurde der Sequenzierreaktionsansatz mit 80 µl Aqua dest. und 10 µl 3M Natriumacetat versetzt und durch Zugabe von 250 µl kaltem Ethanol gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert (13000 rpm, 15 min, 4°C) und das Pellet mit 70%igem kaltem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Vor dem Auftragen auf ein Sequenziergel wurde das Pellet in 3,6 µl 10 mM EDTA/Formamid resuspendiert. Detektion und Analyse erfolgten auf einem Applied Biosystems DNA-Sequencer ABI Prism Modell 377.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultur von *Escherichia coli*

E. coli Bakterien des Stammes DH5 α F wurden in LuriaBertani(LB)-Medium mit Ampicillin (100 μ g/ml) oder Kanamycin (50 μ g/ml) bei 37°C im Schüttler kultiviert.

3.2.2 Kultur von *Salmonella typhimurium*

Salmonella enterica serovar Typhimurium SB824 wurde in LB-Medium mit Kanamycin bei 37°C und 220 rpm kultiviert. *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) und (pHR241) wurden in LB-Medium mit Kanamycin und Ampicillin bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Für *in vitro* und *in vivo* Versuche wurden die Salmonellen in LB-Medium mit 0,3M NaCl sowie Kanamycin und Ampicillin kultiviert, da der höhere Salzgehalt die Expression der Komponenten des Typ III-Sekretionsapparates induziert (Collazo et al., 1996).

3.2.3 Einfrieren von Bakterien

Zur Konservierung von Bakterienklonen wurden Glycerol-Stocks angelegt. Dafür wurden 850 μ l einer Übernachtskultur mit 150 μ l Glycerin versetzt und bei -70°C eingefroren. Die so eingefrorenen Bakterien bleiben lange Zeit vital und können erneut in LB-Medium angeimpft werden.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihres Molekulargewichts auftrennen (Laemmli, 1970). Das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturiert dabei die Proteine und maskiert deren Eigenladungen effektiv, so daß alle Proteine im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei nur vom Molekulargewicht und nicht von der Form der Proteine abhängig. Das diskontinuierliche System mit Sammelgel und Trenngel erreicht hierbei eine besonders gute Auftrennung. Die beiden Geltypen unterscheiden sich in ihrem Gehalt an Acrylamid (Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid 29:1) sowie in

ihrem pH-Wert. Während der Elektrophorese kommt es zu einer Fokussierung der Proteine an der Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel in einer scharfen Bande, im Trenngel werden die Proteine dann entsprechend ihrer Größe getrennt.

Es wurden 12,5%ige Polyacrylamidgele verwendet (siehe Material 2.8.2). Die Proben wurden in Beladungspuffer fünf Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V über etwa eine Stunde.

3.3.1.1 Coomassiefärbung

Coomassie-Brillantblau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der relativ unspezifisch an verschiedene Aminosäure-Seitenketten von Proteinen bindet. Dadurch können Proteine direkt im SDS-Polyacrylamidgel angefärbt werden. Hierfür wurden die Gele etwa eine Stunde bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend über Nacht in Wasser entfärbt. Die Trocknung erfolgte mit Hilfe von Cellophanfolien.

3.3.1.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine deutlich empfindlichere Methode, um Proteine im Polyacrylamidgel nachzuweisen. Das Prinzip beruht auf der Komplexbildung von Silberionen durch Aminosäure-Seitenketten und darauf folgende Reduktion zu metallischem Silber.

Für die Silberfärbung wurden Polyacrylamidgele zunächst eine Stunde fixiert, anschließend zweimal 20 Minuten in Waschpuffer gewaschen und eine Minute in Sensibilisierungspuffer inkubiert. Nach kurzem Spülen in Aqua dest. wurden die Gele 20 Minuten in Silbernitratlösung imprägniert, darauf mit Aqua dest. gespült und in Entwicklerlösung gegeben. Nach spätestens 10 Minuten wurde die Entwicklung durch kurzes Spülen in Aqua dest. und anschließende Inkubation in Fixierer gestoppt. Nach erneutem Spülen in Wasser wurden die Gele zwischen Cellophanfolien getrocknet.

3.3.2 Western Blot

Beim Western Blotting werden Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Anschließend können die Proteine selektiv durch spezifische Antikörper, Lektine oder auch Enzysubstrate nachgewiesen werden.

In diesem Fall wurde das Semi-Dry-Verfahren angewendet. Auf eine Kathodenplatte wurden luftblasenfrei drei in CAPS-Puffer äquilibrierte Whatman-Filterpapiere aufgelegt,

darauf das Gel, darüber die Nitrocellulosemembran und drei in Anodenpuffer CAPS-Puffer äquilibrierte Whatman-Filterpapiere. Darüber wurde die Anodenplatte aufgelegt. Der Transfer erfolgte bei 1 mA/cm^2 Gel für eine Stunde.

Im Anschluß wurde die Membran eine Stunde in PBS-Tween mit 4% Milchpulver gelegt, um unspezifische Antikörperbindung an die Membran zu verhindern. Der Blot wurde dann in PBS-Tween gewaschen, bevor der erste Antikörper zugegeben wurde. Der primäre Antikörper wurde in PBS mit 1% BSA und 0,01% Natriumazid verdünnt (siehe Tabelle 3.2). Anschließend wurde der Blot gründlich in PBS-Tween gewaschen. Die Bindung des zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers erfolgte ebenfalls über eine Stunde. Der sekundäre Antikörper wurde in Blockpuffer verdünnt (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: *Verwendete Antikörper für den Western Blot*

Die Tabelle zeigt die im Western Blot verwendeten primären und sekundären Antikörper und deren Verdünnung

Antikörper	Verdünnung
Maus anti-M45	1:50
Kaninchen anti-Maus Ig – HRP	1:2000

Nach einem abschließenden Waschgang wurden die gebundenen Antikörper mit Hilfe des ECL-Detektionskits (Amersham) nach den Angaben des Herstellers detektiert. Die Membran wurde dann in einer Röntgenfilmkassette auf einen Film aufgelegt und für einen Zeitraum zwischen 10 Sekunden bis mehrere Stunden exponiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

3.3.3 Nachweis der Expression von YopE-CSP

Um die Expression des Fusionsmoleküls YopE-CSP im Western Blot nachzuweisen, wurden Übernachtskulturen von *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) in frisches LB-Medium mit Antibiotika überimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 37°C im Schüttler kultiviert. Die Bakterien wurden dann pelletiert (4000 rpm, 20 Min, 4°C). Der Kulturüberstand wurde durch einen $0,2 \mu\text{m}$ Filter gegeben, um restliche Bakterien zu entfernen, und die Proteine wurden mit Trichloressigsäure gefällt.

3.3.3.1 Trichloressigsäurefällung von Proteinen

Der bakterienfreie Kulturüberstand wurde mit Trichloressigsäure auf eine Endkonzentration von 10% gebracht und für zwei Stunden auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden die gefällten Proteine abzentrifugiert (13000 rpm, 20 Min, 4°C). Das Pellet wurde einmal mit kaltem Aceton gewaschen und nach dem Trocknen in 50 mM Tris pH 8,0 aufgenommen.

Aliquots von Bakterienpellet und gefällten Proteinen aus dem Kulturüberstand wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden in CO₂-Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Lösungen und Labormaterialien aus Kunststoff wurden vor Gebrauch für 20 Minuten bei 135°C und 2,2 bar autoklaviert. Glasgeräte wurden für drei Stunden bei 180°C sterilisiert.

3.4.2 Auftauen und Einfrieren eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen können in flüssigem Stickstoff (-196°C) lange gelagert und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen werden. Um die Bildung von Eiskristallen in den Zellen zu verhindern, wurde ihnen langsam das stark hygroskopische Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben. Mindestens 5×10^6 Zellen wurden in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen auf -70°C abgekühlt, bevor sie nach 24 Stunden in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

Nach dem Auftauen kryokonservierter Zellen wurden diese mehrfach mit Kulturmedium gewaschen, um das toxische DMSO zu entfernen.

3.4.3 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Lebendzellzahl wurde durch den Trypanausschlußtest bestimmt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aktiv aus dem Zellinneren aus, während tote Zellen angefärbt werden. Ein Aliquot Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen Trypanblaulösung gemischt, und die Zellzahl unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt.

3.4.4 Zelllinien und ihre Kultur

Die eukaryotische Zelllinie P388D₁ wurde in RPMI-Medium mit 10% FCS und ohne Zugabe eines Antibiotikums kultiviert. Die adherent wachsenden Zellen wurden in kleinen Zellkulturflaschen oder 6-Loch-Kulturplatten kultiviert, bis der Boden von einem konfluenten Zellrasen bedeckt war. Dann wurden die Zellen mit einer Glaspipette abgespült, einmal mit Medium gewaschen und je nach Bedarf 1:3 bis 1:10 in neuem Medium ausverdünnt.

3.4.5 *In vitro* Infektion eukaryotischer Zellen mit *S. typhimurium* SB824

P388D₁-Zellen wurden in 6 Loch-Platten in RPMI-Medium ohne Antibiotikum bis zur Konfluenz kultiviert. Salmonellen wurden vor der Infektion in LB-Medium mit 0,3M NaCl und Antibiotika bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert. Dann wurden die Bakterien pelletiert (4000 rpm, 20 Min, 4°C) und einmal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 10, 1 oder 0,1 zu den Zellen gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Infektionsmedium entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit gentamycinhaltigem RPMI-Medium gespült und dann weitere 30 Min in diesem Medium inkubiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen als APZ in einem ELISPOT eingesetzt.

3.4.6 Präparation muriner Milzzellen

Die präparierte Milz der Maus wurde mit Hilfe einer Kanüle mit 10 ml Erythrozytenlyse-Puffer gründlich durchgespült. Die Zellsuspension wurde anschließend zweimal mit RPMI-Medium mit 10% FCS gewaschen (1200 rpm, 4°C, 10 min), bevor die Zellzahl bestimmt wurde.

3.4.7 Präparation muriner Leberzellen

Vor der Entnahme wurde die Leber über die Pfortader mit 5 ml PBS/10%FCS durchspült. Anschließend wurde die Leber herauspräpariert und zerrieben. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (Cell strainer, Falcon/Becton Dickinson) gegeben, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten und anschließend bei 1400 rpm und 4°C 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml purem RPMI-Medium aufgenommen und mit

5,5 ml 30%iger Nycodenz[®] Lösung versetzt. Dabei handelt es sich um eine Lösung zur Herstellung von Dichtegradienten zur Aufreinigung von Zellen oder Zellorganellen. Die Suspension wurde anschließend unter 2 ml RPMI-Medium geschichtet. Die Auftrennung der Zellen erfolgte bei 2500 rpm und 4°C über 20 Min. Die Lymphozytenpopulation konnte anschließend mit Hilfe einer Pipette abgenommen werden. Die Zellen wurden einmal in RPMI-Medium mit 10% FCS gewaschen (1200 rpm, 4°C, 10 Min), bevor die Zellzahl bestimmt wurde.

3.4.8 Präparation von Zellen aus dem peripheren Blut

Über die Schwanzvene wurde Mäusen ca. 100 µl Blut entnommen. Dieses wurde in einem EDTA-beschichteten Gefäß gesammelt und mit 10 µl Heparin versetzt, um eine Agglutination zu verhindern. Das Blut wurde mit 10 ml Erythrozytenlyse-Puffer für 5 Min gemischt und anschließend bei 1200 rpm und 4°C 10 Min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in RPMI mit 5 % FCS aufgenommen.

3.4.9 Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT)

Der ELISPOT ist eine vom ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) abgewandelte Methode, um einzelne Zytokin- oder Antikörper-produzierende Zellen nachzuweisen (Czersinsky et al., 1983). Er wurde hier zum Nachweis IFN γ -sezernierender Zellen genutzt.

Hierfür wurden 96-Loch HSA[™] Platten (Millipore) mit 5 µg/ml anti-IFN γ -Antikörper über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend wurden freie Bindungsstellen mit PBS/1%BSA für zwei Stunden bei RT blockiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit PBS wurden 2×10^5 Zellen je Loch zugegeben. Die Zellen wurden nur in Medium inkubiert oder mit 3 µg/ml anti-CD3-Antikörper, 1 µg/ml CSP₅₇₋₇₀, 1 µg/ml CSP₂₄₅₋₂₅₃ oder 0,1 µg/ml OVA₂₅₇₋₂₆₄ für 18 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Platte dreimal gewaschen und mit 2 µg/ml Biotin-konjugiertem anti-IFN γ -Antikörper für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde ein Avidin-HRP-Konjugat (1:400) für eine Stunde bei 37°C zugegeben. Nach dreimaligem Waschen wurde dann eine Substratlösung zugegeben. Diese enthält neben H₂O₂ und NiCl das Substrat Diaminobenzidin. Das bräunliche Produkt dieses Substrats geht nach der enzymatischen Umsetzung nicht in Lösung sondern bleibt im reaktiven Zentrum der Peroxidase gebunden und erscheint in Form von dunklen Punkten (Spots). Nach

Erreichen einer sichtbaren Färbung wird die Reaktion mit Wasser gestoppt. Die Zahl der Spots mit Hilfe eines ELISPOT-Readers bestimmt werden kann. Das Ergebnis wird in *spot forming units* (sfu, Zahl der spots pro 10^6 Zellen) angegeben.

3.4.10 Messung der Zellproliferation

Das Prinzip dieser Messung beruht darauf, dass sich teilende Zellen DNA synthetisieren. Man stellt den Zellen einen radioaktiv markierten Baustein der DNA zur Verfügung (^3H -Thymidin) und misst anschließend die Radioaktivität. Je stärker Zellen proliferieren, desto mehr ^3H -Thymidin bauen sie ein, und desto höher ist demzufolge die Radioaktivität.

Hier wurden jeweils 1×10^5 Milzzellen in einem Volumen von 200 μl je Vertiefung einer 96 Loch-Mikrotiterplatte eingesetzt. Zur Stimulation wurde das Fusionsmolekül ACT-CSP in einer Endkonzentration von 0,01 bis 1,0 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden die Milzzellen nur mit Medium sowie mit dem gesamten Protein Ovalbumin (50 $\mu\text{g/ml}$) und mit dem Molekül ACT-control (1,0 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Milzzellen, die mit dem Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) in einer Endkonzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert wurden. Nach 48stündiger Kultur wurden je 100 μl Überstand abgenommen und ^3H -Thymidin (0,5 μCi je Vertiefung) für weitere 6 bis 12 Stunden zugegeben.

Für die Messung der eingebauten Radioaktivität wurden die Zellen mit einem Zellerntegerät geerntet, wobei die Zellen mit Aqua dest. lysiert und durch einen Gfasfaserfilter gesaugt wurden. Die DNA wurde dabei in dem Filter zurückgehalten. Der getrocknete Filter wurde mit Szintillationsflüssigkeit getränkt, die β -Strahlung in Lichtblitze umwandelt. Die Radioaktivität wurde dann mit einem β -Counter bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde in Zerfällen pro Minute (*counts per minute*, cpm) angegeben.

3.4.11 Immunfluoreszenz

Aliquots von Übernachtskulturen verschiedener Salmonellen-Stämme wurden auf Objektträger aufgetropft und getrocknet. Mit PBS/4%PFA wurden die Bakterien 15 Min fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Mit CohnII (humane IgG-Fraktion) wurden 20 Min unspezifische Bindungen geblockt. Die Salmonellen wurden dann mit einem anti-Salmonella Anti-O4,5 (Gruppe B) Kaninchenserum (DADE Behring) sowie einem

monoklonalen anti-M45-Antikörper 30 Min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden als Zweitantikörper anti-Kaninchen IgG (Caltag) und anti-Maus IgG (DAKO AS) für 30 Min zugegeben. Anschließend wurden die Objektträger fünf mal mit PBS gewaschen, mit Permafluor betropft und einem Deckgläschen abgedeckt.

Tabelle 3.3: *Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz*

Die Tabelle zeigt die in der Immunfluoreszenz verwendeten primären und sekundären Antikörper und deren Verdünnung

Antikörper	Verdünnung
Maus anti-M45	1:200
Salmonella anti O-4,5 Kaninchenserum	1:500
anti-Kaninchen IgG - TRITC	1:100
anti-Maus IgG - FITC	1:100

3.4.12 Durchflusszytometrische Analysen

Durchflusszytometer sind optoelektrische Messsysteme, die optische Signal unterschiedlicher Qualität (Lichtstreuung und Fluoreszenzsignale) detektieren. Im Durchflusszytometer wird die zu analysierende Zellsuspension in Einzelzellsuspension gebracht und die vereinzelt Zellen in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Photomultiplikatoren messen dabei die Streuung des Laserlichts. Die Vorwärtstreuung korreliert mit der Größe der Zellen, die seitliche Streuung mit der Granularität. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können zudem unterschiedliche Zellpopulationen anhand ihres Repertoires an Oberflächenmarkern voneinander abgegrenzt werden. Dafür werden Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt, die gegen verschiedene Oberflächenproteine der unterschiedlichen Zellpopulationen gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind. Die gebräuchlichsten Fluorochrome sind Phycoerythrin (PE), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Allophycocyanin (APC).

Die Färbungen wurden bei 4°C durchgeführt. Pro Färbung wurden 2×10^5 bis 1×10^6 Zellen pelletiert (1200 rpm, 4°C, 5 min). Die Fc-Rezeptoren der Zellen wurden mit 50 µl Cohn II-Lösung zehn Minuten blockiert.

Für die Detektion CSP-spezifischer T-Zellen wurden $6-8 \times 10^5$ Zellen mit 4 µl eines H2-K^d-Pentamers, das mit dem CSP-Peptid SYIPSAEKI beladen und mit dem Fluorochrom APC markiert war, inkubiert. Nach zehn Minuten wurden die monoklonalen Antikörper anti-CD8 (1:400) und anti-CD62L (1:200) oder anti-CD44 (1:200) für weitere

30 Min zugegeben. Die Zellen wurden einmal in FACS-Puffer gewaschen, in 250 μ l PBS/4%PFA fixiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

Für die intrazelluläre Färbung von Foxp3⁺ wurde das Foxp3-PE Staining Kit von eBioscience nach den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden $2-3 \times 10^5$ Zellen pro Färbung eingesetzt. Vor der intrazellulären Färbung mit einem anti-Foxp3-Antikörper, wurden die Zellen auf der Oberfläche mit anti-CD4 (1:200) und anti-CD25 (1:100) gefärbt. Nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen über Nacht mit Fixierungs/Permeabilisierungs-Lösung (Foxp3 Staining Kit, eBioscience) permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit Permeabilisierung-Puffer (Foxp3 Staining Kit, eBioscience) wurde 0,3 μ g anti-Foxp3-Antikörper für 30 Min zugegeben. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierung-Puffer gewaschen, mit 250 μ l PBS/4%PFA fixiert und im Durchflusszytometer analysiert.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe des Programms Cell Quest.

3.5 Tierversuche

Für alle Versuche wurden weibliche, 6 bis 8 Wochen alte BALB/c- oder C57Bl/6-Mäuse eingesetzt.

3.5.1 Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824

Für die Immunisierung wurden *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) oder (pHR241) aus einer Übernachtskultur in 50 ml LB-Medium mit Antibiotika und 0,3M NaCl angeimpft und bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,4 - 0,6$ bei 37°C im Schüttler kultiviert. Die Konzentration der Bakterien wurde anhand einer Standardkurve bestimmt, die zuvor mit Hilfe ausplattierter verdünnter Bakteriensuspensionen erstellt worden war. Die Bakterien wurden pelletiert (4000 rpm, 20 Min, 4°C) und einmal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in PBS aufgenommen.

Die Mäuse erhielten je 5×10^8 Salmonellen in 200 μ l. Die Bakteriensuspension wurde oral mit Hilfe einer Knopfkanüle verabreicht. Deshalb wurde am Abend vor der Immunisierung das Futter aus den Käfigen entfernt, um eine optimale Aufnahme der Bakteriensuspension zu erreichen. Die Mäuse wurden entweder einmal immunisiert, oder sie erhielten dreimal an Tag 0, 3 und Tag 7 Salmonellen. Sechs Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse entweder zur Organentnahme getötet, oder sie wurden mit *P. berghei* Sporozoiten infiziert.

3.5.2 Persistenzanalyse

Um zu untersuchen, ob und wie lange die Salmonellen in den Mäusen persistieren, wurden infizierten Mäusen die Milzen und Lebern sowie Stuhlproben entnommen. Diese wurden in LB-Medium homogenisiert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert, um vorhandene Bakterien anzureichern. Anschließend wurden die Suspensionen in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Agarplatten mit Kanamycin oder Kanamycin / Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anhand der gewachsenen Kolonien konnte zwischen den rekombinanten Salmonellen und Salmonellen, die das Plasmid pST-TB verloren hatten, unterschieden werden.

3.5.3 Immunisierung mit ACT-CSP

BALB/C- und C57Bl/6-Mäuse wurden mit 10 - 20 µg ACT-CSP oder 10 µg ACT-control immunisiert. Das Adenylatcyclasekonstrukt wurde in 200 µl PBS intraperitoneal injiziert. Einige Mäuse erhielten nach 21 Tagen eine Zweitimmunisierung. In einigen Experimenten wurde der monoklonale Antikörper anti-CTLA-4 (4F10) verabreicht. Dafür wurden einen Tag vor der primären oder der zweiten Immunisierung 500 µg Antikörper in 200 µl PBS intraperitoneal injiziert. Sieben Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse entweder zur Organentnahme getötet, oder sie wurden mit *P. berghei* Sporozoiten infiziert.

3.5.4 Infektion mit *P. berghei*

Für die Infektion immunisierter Mäuse wurden *P. berghei* Sporozoiten verwendet, die frisch aus den Speicheldrüsen von Anopheles-Mücken präpariert worden waren (wurden zur Verfügung gestellt von Dr. V. Heussler, BNI Hamburg). Die Sporozoiten wurden 20 bis 25 Tage nach Infektion der Mücken präpariert.

Die immunisierten Mäuse wurden mit je 1000 Sporozoiten in 100 µl PBS intravenös infiziert. Zwischen Tag 6 und 14 nach Infektion wurden regelmäßig Blutaussstriche aus Schwanzblut gemacht, um die Parasitämie zu bestimmen. Dafür wurden die Ausstriche mit Wright's stain-Lösung gefärbt, und die Zahl der infizierten Parasiten wurde mikroskopisch bestimmt. Die Parasitämie wird als prozentualer Anteil der infizierten Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten angegeben.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Fähigkeit zweier verschiedener Antigen-Trägersysteme, eine CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen das Leberstadium der Malaria zu induzieren, untersucht werden. Als Antigen wurde das Hauptoberflächenprotein der Sporozoiten, das Circumsporozoiten-Protein (CSP) gewählt, da aus der Literatur bekannt ist, dass IFN γ -produzierende CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellen einen Schutz gegen die Sporozoiten-Infektion vermitteln können. Als Modell wurde die gut etablierte *Plasmodium berghei*-Infektion, eine lethale Malaria-Infektion der Maus, gewählt. Dies ermöglicht den Vergleich der hier untersuchten mit bereits beschriebenen Antigenträgern. Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, ob sich durch diese Antigenträger eine CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort induzieren lässt, wie langlebig diese ist, und ob sie eine sterile Immunität erzeugen können. Die Arbeit ist in drei Teile gegliedert. Der erste Teil beschreibt die Klonierung und den Einsatz von rekombinanten Salmonellen als Antigenträger. Im zweiten Teil der Arbeit wird die Eignung der Adenylat-Cyclase aus *Bordetella pertussis* als Antigenträger untersucht. Im dritten Teil wird die Kombination der beiden Trägersysteme in einer heterologen *prime/boost*-Immunisierung beschrieben.

4.1 Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen

Im Rahmen der Arbeit wurde ein rekombinanter Salmonellen-Stamm hergestellt, der ein Fusionsmolekül aus dem CSP-Fragment 231-260 und dem YopE-Fragment 1-138 exprimiert. YopE ist ein sehr gut charakterisiertes bakterielles Effektorprotein aus *Yersinia enterocolitica*, das über den Typ III-Sekretionsapparat der Yersinien, aber auch über den Typ III-Sekretionsapparat von Salmonellen, in das Zytosol eukaryotischer Zellen transloziert wird. Die ersten 138 Aminosäuren des Proteins sind ausreichend, um eine Translokation des YopE-CSP-Fusionsmoleküls zu vermitteln. Der CSP-Teil enthält das MHC I-Epitop SYIPSAEKI (CSP₂₄₅₋₂₅₃) (Romero et al., 1989). Es sollte untersucht werden, ob dieses Epitop durch Translokation ins Cytosol von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) gelangt und auf MHC Klasse I-Molekülen präsentiert wird, und ob dadurch eine CSP-spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort induziert werden kann.

Der folgende Teil der Arbeit beschreibt die Klonierung der rekombinanten Salmonellen, deren Charakterisierung *in vitro* und *in vivo*, sowie deren Potenzial, eine protektive Immunantwort zu induzieren.

4.1.1 Klonierung des Expressionsvektors pST-TB

Für die Expression des YopE-CSP-Fusionsmoleküls in Salmonellen wurde der Vektor pST-TB hergestellt. Die Klonierung ist in Abb. 4.1 schematisch dargestellt.

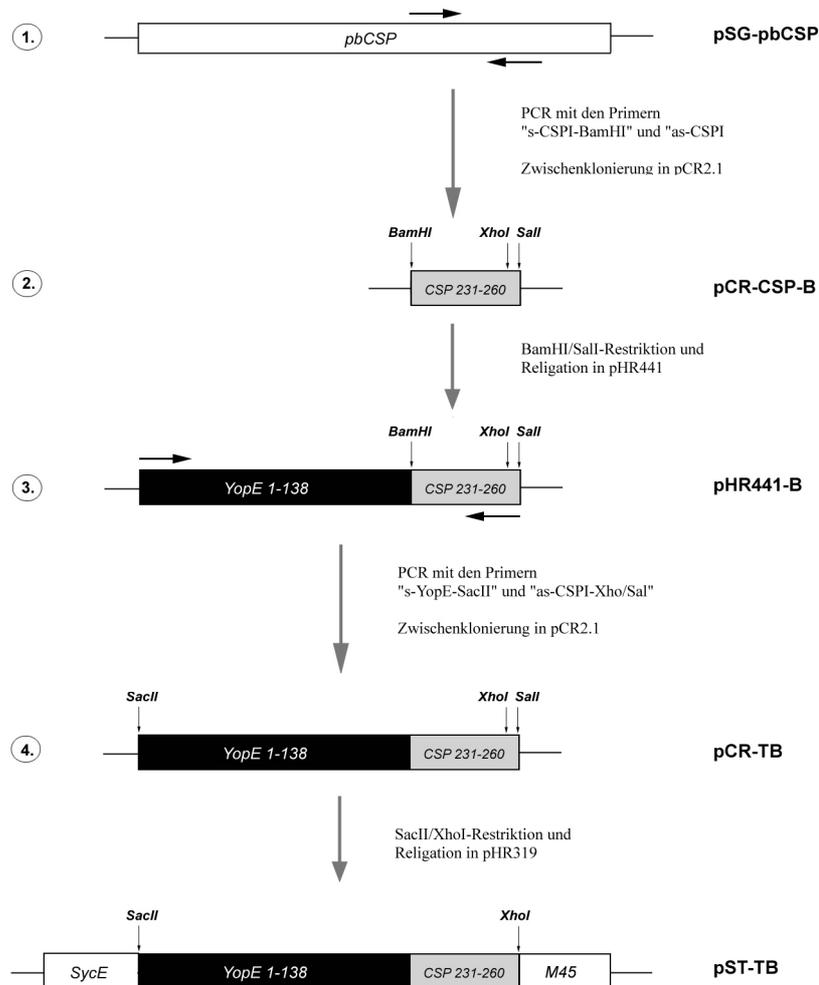


Abb. 4.1) Schema der Klonierungsstrategie für den Vektor pST-TB

Ausgehend vom Vektor pSG-pbCSP wurde die Sequenz CSP₂₃₁₋₂₆₀ mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die eingefügten Schnittstellen durch einen Restriktionsverdau mit BamHI und SalI in den Vektor pHR441 am 3'-Ende der Sequenz von YopE₁₋₁₃₈ eingesetzt. Ausgehend vom resultierenden Plasmid pHR441-B wurde die YopE-CSP-Sequenz amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mittels Restriktionsverdau mit SacII und XhoI in den Expressionsvektor pHR319 eingefügt. Der resultierende Vektor pST-TB enthält 3' der YopE-CSP-Sequenz die Sequenz des M45-Tags. Zudem codiert der Vektor für das Chaperon SycE.

Zunächst wurde ein Fragment des *P. berghei* CSP amplifiziert. Das Protein besitzt im C-terminalen Bereich (AS 245-253) ein H2-K^d MHC I-Epitop (Romero et al., 1989). Für die Klonierung wurde der Bereich CSP₂₃₁₋₂₆₀ ausgewählt, der neben dem CD8-Epitop noch dessen flankierende Sequenzen enthält, um die korrekte Prozessierung im Proteasom zu gewährleisten. Als Template diente der Vektor pSG-pbCSP, der von Dr. Sarah Gilbert (Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, UK) zur Verfügung gestellt wurde. Der Vektor enthält die komplette cDNA-Sequenz des *P. berghei* CSP. Mit Hilfe der Primer „s-CSP I-BamHI“ und „as-CSP I-XhoI/SalI“ wurde die Sequenz von CSP₂₃₁₋₂₆₀ in einer PCR amplifiziert, wobei durch die Primer 5′ eine *Bam*HI- und 3′ eine *Xho*I- und eine *Sal*I-Schnittstelle eingeführt wurden. Das PCR-Produkt (110 bp, Abb. 4.2-A) wurde in den Vektor pCR® 2.1 zwischenkloniert und sequenziert. Für die weitere Klonierung wurde die Plasmid-DNA des Klons pCR-CSP-B/3 verwendet.

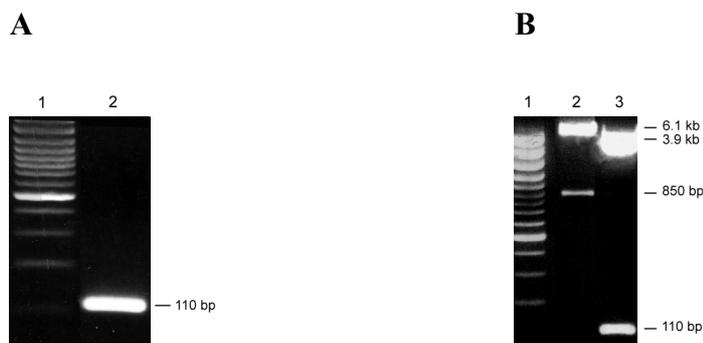


Abb. 4.2) Klonierung der CSP₂₃₁₋₂₆₀-DNA in den Vektor pHR441

A) Das CSP-Fragment CSP₂₃₁₋₂₆₀ wurde in einer PCR mit den Primern „s-CSP I-BamHI“ und „as-CSP I-XhoI/SalI“ vom Vektor pSG-pbCSP amplifiziert, dabei wurden eine 5′-*Bam*HI- und eine 3′-*Xho*I/*Sal*I- Schnittstelle eingeführt. Das 2%ige Agarosegel zeigt das PCR-Amplifikat mit der Größe 110 bp (Spur 2). Spur 1: 100 bp DNA Ladder plus

B) Das 2%ige TAE-Agarosegel zeigt einen präparativen Restriktionsverdau der Vektoren pHR441 (Spur 2) und pCR-CSP-B/3 (Spur 3) mit *Bam*HI/*Sal*I. Der Vektor pHR441 codiert ein Fusionsmolekül aus YopE₁₋₁₃₈ und einem 850 bp großen CSP-Fragment, welches mit *Bam*HI/*Sal*I ausgeschnitten wurde. Aus dem Vektor pCR-CSP-B/3 wurde das 110 bp-Fragment CSP₂₃₁₋₂₆₀ ausgeschnitten. Spur 1: 100 bp DNA Ladder plus

Als Template für den YopE-Teil diente der Vektor pHR441, der von Dr. Holger Rüssmann (Max von Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München) zur Verfügung gestellt wurde. Der Vektor enthält die cDNA-Sequenz des *Y. enterocolitica* YopE₁₋₁₃₈ als Fusionsmolekül mit einem 850 bp großen CSP-Fragment. Über einen Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Sal*I wurde das 850 bp CSP-Fragment

ausgeschnitten und das Amplifikat von CSP₂₃₁₋₂₆₀ eingefügt. Abb. 4.2-B zeigt den präparativen Verdau der Vektoren pHR441 und pCR-CSP-B/3. Für die weitere Klonierung wurde die Plasmid-DNA des Klons pHR441-B/6 verwendet. Ausgehend vom Plasmid pHR441-B/6 wurde in einer PCR mit Hilfe der Primer „s-YopE-SacII“ und „as-CSP I-XhoI/SalI“ die komplette YopE-CSP-Sequenz amplifiziert. Dabei wurde am 5'-Ende eine *SacII*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Das PCR-Amplifikat (670 bp, Abb. 4.3-A) wurde in den Vektor pCR® 2.1 zwischenkloniert und sequenziert. Für die weitere Klonierung wurde der Klon pCR-TB/21 ausgewählt.

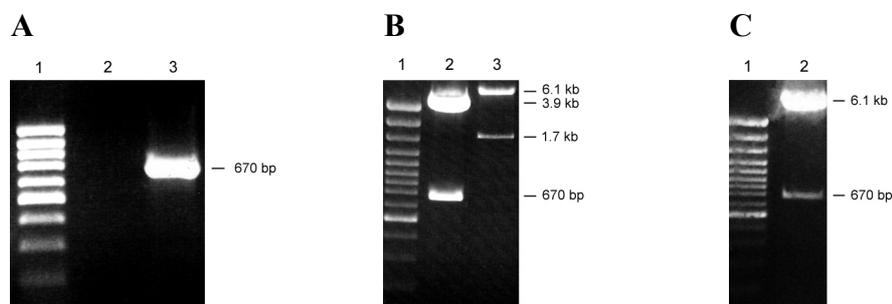


Abb. 4.3) Klonierung des YopE-CSP-Fragments in den Vektor pHR319

A) Das gesamte YopE₁₋₁₃₈ - CSP₂₃₁₋₂₆₀ - Fragment wurde in einer PCR mit den Primern „s-YopE-SacII“ und „as-CSP I-XhoI/SalI“ ausgehend vom Vektor pHR441-B/6 amplifiziert. Dabei wurde eine 5'-*SacII*-Schnittstelle eingeführt. Das 1%ige Agarosegel zeigt das PCR-Produkt (Spur 3) mit einer Größe von 670 bp. Spur 1: 100 bp DNA Ladder plus, Spur 2: leer

B) Das 1%ige Agarosegel zeigt den präparativen Verdau der Vektoren pCR-TB/21 (Spur 2) und pHR319 (Spur 3) mit *SacII* und *XhoI*. pHR319 codiert ein YopE-LLO-Fusionsmolekül von 1.7 kb, das durch den Restriktionsverdau ausgeschnitten und durch das 670 bp-Fragment YopE-CSP aus dem Vektor pCR-TB/21 ersetzt wird. Spur 1: 100 bp DNA Ladder plus

C) Das 1%ige Agarosegel zeigt einen Kontrollverdau des Plasmids pST-TB/5 mit *SacII/XhoI*. Durch den Verdau wird das 670 bp große YopE-CSP-Fragment ausgeschnitten (Spur 2). Spur 1: 100 bp DNA Ladder plus

Der Expressionsvektor für die Expression von YopE-CSP in Salmonellen basiert auf dem Vektor pHR319, der von Dr. Holger Rüssmann (Max von Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München) zur Verfügung gestellt wurde. Der Vektor codiert das YopE-spezifische Chaperon SycE, welches für die Translokation des YopE-Fusionsmoleküls erforderlich ist (Cheng et al., 1999), sowie die Sequenz für das adenovirale Peptid M45, welches dem Nachweis des Fusionsmoleküls im Western Blot und in der Immunfluoreszenz dient. Zudem trägt das Plasmid den *lacZ*-Promotor und ein

Ampicillin-Resistenzgen. Die YopE-CSP-Sequenz wurde über einen Restriktionsverdau mit *SacII* und *XhoI* in den Vektor pHR319 eingefügt. Abb. 4.3-B zeigt den präparativen Verdau der Vektoren pHR319 und pCR-TB/21. Abb. 4.3-C zeigt einen Kontrollverdau des resultierenden Expressionsvektors pST-TB mit den Enzymen *SacII/XhoI*. Für die Transformation in Salmonellen wurde der Klon pST-TB/5 ausgewählt. Im Anhang findet sich eine Plasmidkarte des Vektors.

4.1.2 Expression des YopE-CSP-Fusionsmoleküls in Salmonellen

Mit dem Vektor pST-TB/5 wurden Salmonellen des Stammes *S. typhimurium* SB824 mittels Elektroporation transformiert. Salmonellen dieses Stammes sind *aroA*-defizient und aufgrund ihrer Auxotrophie für bestimmte aromatische Metabolite in ihrer Virulenz stark beeinträchtigt. Zudem trägt der Stamm zur Selektion ein Kanamycin-Resistenzgen. Der Erfolg der Transformation wurde mittels Kolonie-PCR und Kontrollrestriktionsverdau von Plasmid-DNA überprüft. Dann sollte im Western Blot nachgewiesen werden, ob das YopE-CSP-Fusionsmolekül exprimiert wird. Dafür wurden Aliquots der Bakterienpellets sowie Proteine der Kulturüberstände durch SDS-PAGE und anschließenden Western Blot analysiert. Abb. 4.4-A zeigt einen Western Blot des Klons SB824 (pST-TB)-3, der für alle folgenden Experimente verwendet wurde. Sowohl im Bakterienpellet als auch im Kulturüberstand ließ sich das YopE-CSP-Fusionsmolekül durch einen monoklonalen anti-M45-Antikörper nachweisen. Die Größe von ca. 24 kD entspricht dem errechneten Molekulargewicht, wobei das Protein in der Pelletfraktion ein etwas verändertes Laufverhalten aufgrund der großen Menge aufgetragener Bakterien-suspension zeigt.

Zudem wurde die Expression des Fusionsmoleküls mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dafür wurden Aliquots der nicht transformierten Salmonellen und des Klons SB824 (pST-TB)-3 auf Objektträger aufgebracht, fixiert und mit einem anti-Salmonella O-4,5 Kaninchenserum sowie dem anti-M45-Antikörper gefärbt. Abb. 4.4-B zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der nicht transformierten Salmonellen und des Klons SB824 (pST-TB)-3. Bei den nicht transformierten Salmonellen war erwartungsgemäß kein M45-Fusionsmolekül nachweisbar, während der transformierte Stamm mit dem anti-M45-Antikörper angefärbt werden konnte.

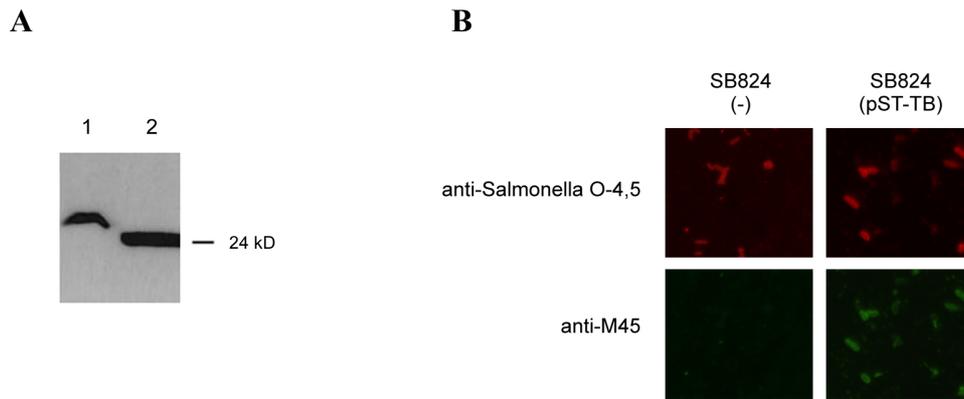


Abb. 4.4) Nachweis der Expression des YopE-CSP-Fusionsmoleküls

A) Der Western Blot zeigt Aliquots von Bakterienpellet (Spur 1) und Überstand (Spur 2) einer Kultur des Klons *S. typhimurium* SB824 (pST-TB)-3. Das YopE-CSP-Fusionsmolekül wurde durch einen monoklonalen anti-M45-Antikörper nachgewiesen. Die Größe von ca. 24 kD entspricht der errechneten Größe.

B) Aliquots des Klons *S. typhimurium* SB824 (pST-TB)-3 und der nicht transformierten Salmonellen wurden auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem anti-Salmonella O-4,5 Kaninchenserum (rot) und dem anti-M45-Antikörper (grün) gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

4.1.3 *In vitro* Nachweis der Prozessierung und MHC I-Präsentation des CSP-Epitops

Um eine CSP-spezifische T-Zellantwort zu induzieren, muss das YopE-CSP-Fusionsmolekül nicht nur ins Zytosol von antigenpräsentierenden Zellen transloziert werden, sondern dort auch korrekt prozessiert und auf MHC I-Molekülen präsentiert werden. Um dies zu überprüfen, wurde ein *in vitro* Antigenpräsentationstest etabliert.

Da keine CSP-spezifische T-Zelllinie zur Verfügung stand, wurde eine BALB/c-Maus mit Hilfe des Adenylatcyclase-Konstrukts ACT-CSP immunisiert. Die Wirkungsweise dieser Immunisierung wird im zweiten Teil dieser Arbeit beschrieben (s. Kapitel 4.2). Durch intraperitoneale Injektion von 20 µg ACT-CSP werden CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellen induziert, die in Milz, Leber und Blut zu finden sind. Für den Antigenpräsentationstest wurden Milzzellen einer immunisierten Maus isoliert und mit P388D₁-Zellen als APZ stimuliert. Dabei handelt es sich um eine murine Makrophagen-ähnliche Zelllinie. Die P388D₁-Zellen wurden für zwei Stunden mit Salmonellen infiziert, dann mit antibiotikahaltigem Medium gründlich gewaschen und als APZ zusammen mit den Milzzellen in einem IFN γ -ELISPOT eingesetzt. Sofern das YopE-CSP-Fusionsmolekül erfolgreich in die P388D₁-Zellen transloziert und von diesen zur Präsentation auf MHC I

prozessiert wird, sollten hierbei aktivierte CSP-spezifische T-Zellen nachweisbar sein, die IFN γ produzieren. Der Versuchsablauf ist in Abb. 4.5-A schematisch dargestellt.

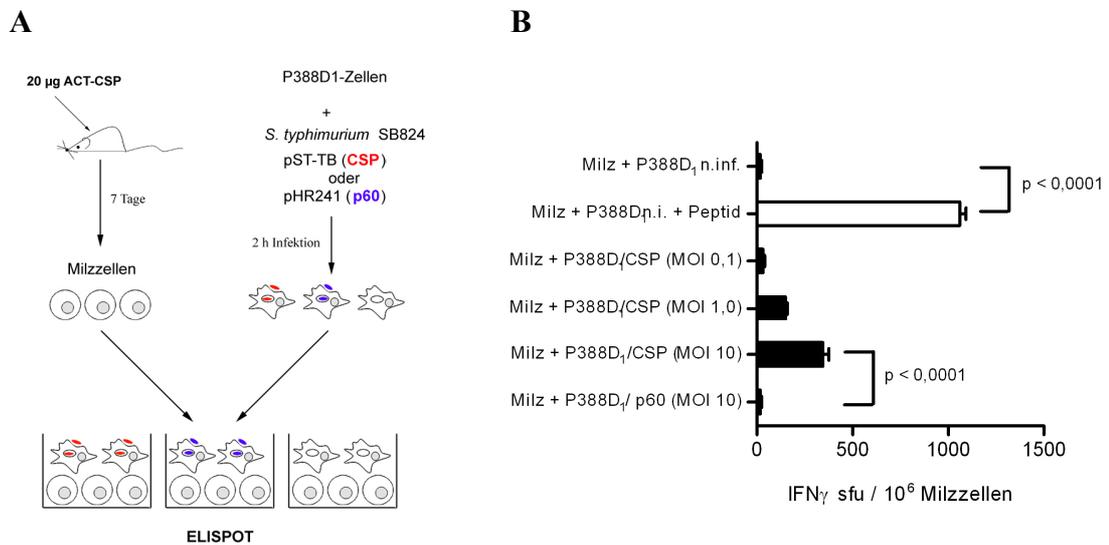


Abb. 4.5) In vitro Antigenpräsentationstest

A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Eine BALB/c-Maus wurde durch intraperitoneale Injektion von 20 μ g ACT-CSP immunisiert. Nach sieben Tagen wurden die Milzzellen der Maus isoliert. Als APZ dienten P388D₁-Zellen, die zuvor entweder mit dem Stamm *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) oder (pHR241) infiziert worden waren. Die infizierten P388D1 wurden zusammen mit den Milzzellen der immunisierten Maus inkubiert und die Zahl der IFN γ -produzierenden Zellen wurde mittels ELISPOT bestimmt.

B) Gezeigt ist das Ergebnis eines IFN γ -ELISPOT. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und SEM aus Triplikaten. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt. Gezeigt ist eines von zwei Experimenten.

Das Ergebnis des Antigenpräsentationstests ist in Abb. 4.5-B gezeigt. Die Inkubation der Milzzellen mit den nicht infizierten P388D₁-Zellen führte zu keiner Aktivierung der Milzzellen. Ebenso waren keine IFN γ -produzierenden Zellen nachweisbar, wenn die P388D₁-Zellen mit dem Kontrollstamm *S. typhimurium* SB824 (pHR241), der das Antigen p60 aus Listerien als YopE-Fusionsmolekül exprimiert, infiziert wurden. Die Stimulation der Milzzellen mit dem CSP-Peptid SYIPSAEKI führte als Positivkontrolle erwartungsgemäß zu einer starken Aktivierung mit etwa 1000 sfu (spot forming units pro 10⁶ Zellen). Die Infektion der APZ mit dem YopE-CSP-exprimierenden Salmonellenstamm SB824 (pST-TB) schließlich führte ebenfalls zu einer gesteigerten Anzahl an IFN γ -Produzenten. Dabei wurden in Abhängigkeit von der Zahl der Salmonellen bis zu 400 sfu gemessen.

Mit diesem *in vitro*-Antigenpräsentationstest konnte gezeigt werden, dass es zu einer korrekten Prozessierung des YopE-CSP-Fusionsmoleküls kommt, und dass das CSP-Epitop SYIPSAEKI auf MHC I-Molekülen präsentiert wird.

4.1.4 Persistenz der rekombinanten Salmonellen in BALB/c-Mäusen und Plasmidstabilität

Für die orale Immunisierung von Mäusen wurde die in der Literatur für diesen Stamm angegebene Dosis von 5×10^8 Salmonellen eingesetzt (Rüssmann et al., 2001). Diese Dosis war für die BALB/c-Mäuse gut verträglich, und sie zeigten keine Krankheitssymptome. Um zu überprüfen, ob die attenuierten Salmonellen überhaupt in der Lage sind, BALB/c-Mäuse zu infizieren und in verschiedene Organe zu disseminieren, wurde eine Persistenzanalyse durchgeführt. Dafür wurden Gruppen von Mäusen mit je 5×10^8 Salmonellen des Stamms SB824 (pST-TB)-3 oral infiziert. Nach 1, 3 und 5 Tagen wurden Proben von Milz, Leber und Stuhl der Mäuse entnommen, homogenisiert und in LB-Medium 24 Stunden bei 37°C inkubiert, um vorhandene Bakterien anzureichern. Die Suspensionen wurden dann in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Agarplatten mit verschiedenen Antibiotika ausplattiert. So konnte zwischen den mit pST-TB transformierten Salmonellen (Ampicillin-/Kanamycin-resistent) und den Salmonellen, die das Plasmid verloren hatten (Kanamycin-resistent) unterschieden werden. Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse der Persistenzanalyse zusammen. Wie aus Tab. 4.1 ersichtlich wird, verlief die Infektion von BALB/c-Mäusen mit dem Stamm SB824 (pST-TB) sehr unterschiedlich. Obwohl zunächst alle Mäuse infiziert sind, können die Salmonellen aufgrund ihrer Attenuierung zum Teil Leber und Milz nicht besiedeln oder werden dort schnell entfernt. Auch die Plasmidstabilität ist unterschiedlich. So ist das Plasmid pST-TB in diesem Experiment schon nach fünf Tagen nicht mehr nachweisbar, in einigen Mäusen geht es schon früher verloren. In anderen Experimenten wurden jedoch noch an Tag 20 nach Infektion in einzelnen Mäusen Salmonellen mit dem Plasmid pST-TB im Stuhl nachgewiesen. Die Infektion verläuft also extrem unterschiedlich. Diese individuellen Unterschiede stellen vermutlich einen limitierenden Faktor für die Effizienz der Salmonellen als Antigenträger dar.

Tab. 4.1) Persistenzanalyse des *S. typhimurium* Stammes SB824 (pST-TB)

BALB/c-Mäuse wurden mit 5×10^8 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) oral infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben von Stuhl, Milz und Leber entnommen und homogenisiert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden die Suspensionen auf LB-Platten mit verschiedenen Antibiotika ausplattiert.

Symbole: + bedeutet Nachweis von Salmonellen / des Plasmids pST-TB;
 - bedeutet keine Salmonellen / kein Plasmid nachweisbar

		Stuhl	Milz	Leber
Tag 1 p.i.	Maus 1	+/+	-/-	-/-
	2	+/+	+/-	+/+
	3	+/+	-/-	-/-
Tag 3 p.i.	Maus 1	+/-	+/-	-/-
	2	+/+	+/+	+/+
	3	+/+	+/-	-/-
Tag 5 p.i.	Maus 1	+/-	-/-	-/-
	2	-/-	-/-	-/-
	3	+/-	-/-	-/-

4.1.5 Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB)

Nachdem *in vitro* gezeigt wurde, dass eine Translokation des YopE-CSP-Fusionsmoleküls in das Zytosol eukaryotischer Zellen und eine anschließende Präsentation auf MHC I - Molekülen stattfindet, wurde nun untersucht, ob durch die Immunisierung eine CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort induziert werden kann. Dafür wurden BALB/c-Mäuse oral mit 5×10^8 rekombinanten Salmonellen immunisiert. Nach sechs Wochen wurden Milzzellen isoliert, und die Zahl der IFN γ -produzierenden CSP-spezifischen T-Zellen wurde im ELISPOT bestimmt. Abb. 4.6 fasst die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten zusammen.

Dabei zeigt sich, dass durch die Immunisierung mit den rekombinanten Salmonellen zwar in fast allen Mäusen eine CSP-spezifische Antwort induziert wurde, deren Mittel bei etwa 350 IFN γ sfu liegt. Aber es wird auch deutlich, dass die Effizienz der Immunisierung sehr unterschiedlich ist. So variiert die CSP-spezifische T-Zellantwort in den einzelnen Mäusen zwischen 100 und 1200 sfu in der Milz. Diese Zahlen korrelieren mit der Dauer der Infektion der einzelnen Mäuse, d.h. die Mäuse, in deren Ausscheidungen am längsten

Salmonellen nachgewiesen werden konnten, zeigten die höchsten T-Zellantworten (Daten nicht gezeigt).

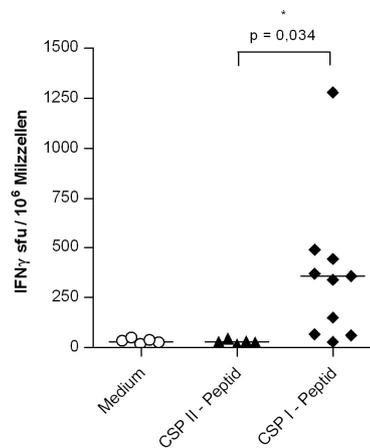


Abb. 4.6) IFN γ -ELISPOT von Milzzellen aus BALB/c nach Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB)

BALB/c-Mäuse wurden einmal oral mit 5×10^8 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) immunisiert. Sechs Wochen nach Immunisierung wurden aus den Mäusen Milzzellen aufgereinigt, und die Zahl der CSP-spezifischen IFN γ -produzierenden T-Zellen wurde mittels ELISPOT bestimmt. Je $2,5 \times 10^5$ Milzzellen wurden mit Medium, dem CSP-Peptid II (CSP₅₇₋₇₀) oder dem CSP-Peptid I (CSP₂₄₅₋₂₅₃) stimuliert. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten von je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test berechnet (unpaired, one-tailed).

Dargestellt ist eine Zusammenfassung aus zwei unabhängigen Experimenten.

Um dieses Problem der stark heterogenen Infektion der Mäuse zu überwinden, wurden in den folgenden Experimenten die Salmonellen dreimal im Abstand von drei Tagen verabreicht. Dadurch sollte die Persistenz der Salmonellen und die Gegenwart des Antigens verlängert werden. Jeweils sechs Wochen nach Immunisierung wurden Milzzellen isoliert, und die Zahl der CSP-spezifischen IFN γ -produzierenden T-Zellen wurde mittels ELISPOT bestimmt. In Abb. 4.7 sind die einmalige und die dreimalige Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit den rekombinanten Salmonellen gegenübergestellt. Dabei zeigt sich, dass die wiederholte Gabe der rekombinanten Salmonellen zu einer signifikanten Steigerung der CSP-spezifischen T-Zellantwort führt, die bei den dreifach immunisierten Mäusen im Mittel bei etwa 750 IFN γ sfu liegt. Allerdings verbesserte die dreimalige Gabe der Salmonellen nicht die Homogenität der Immunantwort zwischen den einzelnen Mäusen, sie variierte zwischen 250 und 1250 sfu.

Das Problem der starken individuellen Unterschiede liegt vermutlich in der individuellen Immunreaktion gegen den Antigenträger begründet.

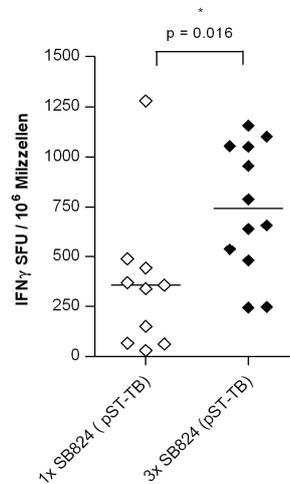


Abb. 4.7) IFN γ -ELISPOT von Milzzellen nach ein- bzw. dreimaliger Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB)

BALB/c-Mäuse wurden an Tag 0, 3 und 7 oder nur an Tag 7 mit je 5×10^8 Salmonellen oral immunisiert. Nach sechs Wochen wurden die Milzzellen der Mäuse isoliert, und die Zahl der CSP-spezifischen T-Zellen wurde mittels ELISPOT bestimmt. Gezeigt ist die Zahl der IFN γ -produzierenden T-Zellen nach Stimulation mit dem CSP₂₄₅₋₂₅₃-Peptid. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten von je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

Dargestellt ist eine Zusammenfassung aus drei unabhängigen Experimenten.

IFN γ -produzierende CD8⁺ T-Zellen gelten als Hauptakteure der protektiven Immunantwort gegen das Leberstadium der Malaria. Jedoch werden in Folge der Immunisierung auch CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellen mit anderen Effektorfunktionen induziert, die z.B. zytotoxische Aktivität haben oder andere Zytokine wie TNF- α produzieren können. Um diese antigenspezifischen T-Zellen zu detektieren, wurde die Technik der MHC-Multimer-Färbung in der Durchflußzytometrie genutzt. Dafür wurde ein H2-K^d - Pentamer verwendet, das mit dem Peptid SYIPSAEKI (CSP₂₄₅₋₂₅₃) beladen wurde. Das Pentamer wurde zudem mit dem Farbstoff Allophycocyanin (APC) markiert, und konnte somit in der Durchflußzytometrie detektiert werden. Mit diesem H2-K^d / SYIPSAEKI - Pentamer lassen sich einzelne T-Zellen, deren T-Zellrezeptor spezifisch das CSP-Epitop SYPSAEKI erkennt, detektieren und analysieren.

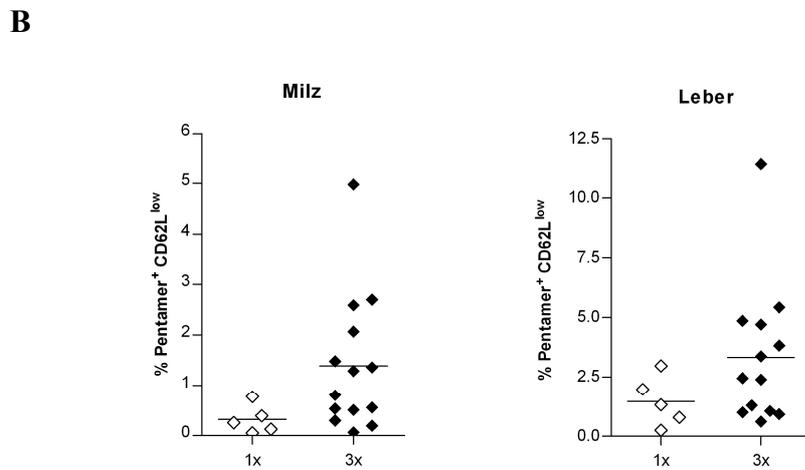
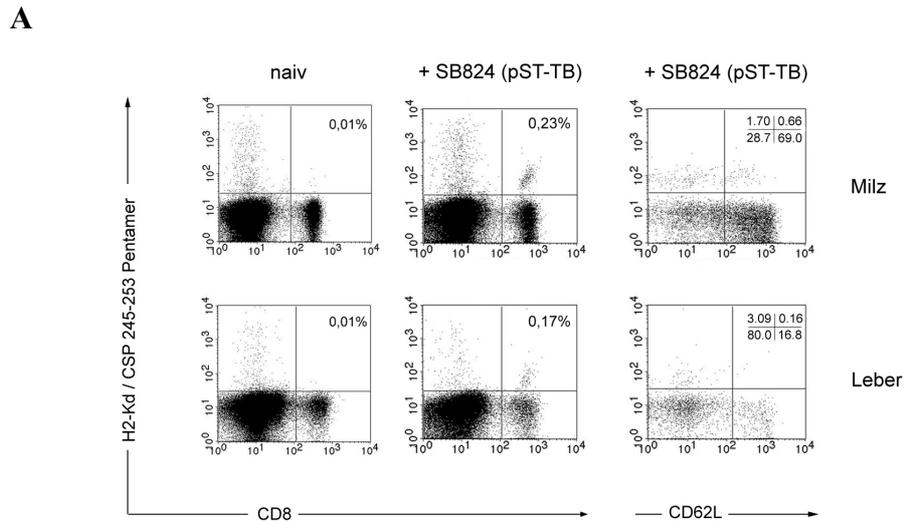


Abb. 4.8) Durchflußzytometrische Analyse CSP-spezifischer T-Zellen

Zellen aus Milz und Leber von BALB/c-Mäusen, die einmal oder dreimal mit 5×10^8 SB824 (pST-TB) immunisiert worden waren, wurden mit einem H2-K^d / CSP₂₄₅₋₂₅₃ - Pentamer sowie anti-CD8- und anti-CD62L-Antikörpern gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert.

A) Gezeigt sind Beispielfärbungen von Zellen aus einer naiven und einer dreimal immunisierten Maus. Die linken vier Diagramme zeigen die Pentamer/CD8-Färbung von Gesamtymphozyten. Der Hintergrund an Pentamer⁺ Zellen in der CD8⁻ Population wird hauptsächlich durch B-Zellen verursacht (Daten nicht gezeigt). Die beiden rechten Diagramme zeigen die CD62L/Pentamer-Färbung von CD8⁺ Zellen.

B) Die Diagramme fassen die Frequenz von aktivierten CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber von einmal bzw. dreifach immunisierten Mäusen sechs Wochen nach Immunisierung zusammen. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus, die Balken geben die Mittelwerte aller Messwerte einer Gruppe an.

Abb. 4.8-A zeigt Beispielfärbungen von Milz- und Leberzellen aus immunisierten Mäusen mit dem Pentamer sowie anti-CD8 und anti-CD62L. CD62L (L-Selectin) ist ein Homingrezeptor von Lymphozyten, der auf aktivierten T-Zellen von der Oberfläche verschwindet und somit der Unterscheidung von aktivierten ($CD62L^{low}$) und ruhenden bzw. naiven ($CD62L^{high}$) T-Zellen dient. Aktivierte CSP-spezifische T-Zellen konnten in Milz, Leber und Blut (nicht gezeigt) von immunisierten Mäusen nach ein- und dreimaliger Immunisierung nachgewiesen werden. Die orale Immunisierung mit den rekombinanten Salmonellen induziert also eine systemische Immunantwort. Dabei ist vor allem die Präsenz der CSP-spezifischen T-Zellen in der Leber von Bedeutung, da dieses Organ das Ziel der Sporozoiten ist.

In Abb. 4.8-B ist die Gesamtzahl der CSP-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen nach einmaliger oder dreimaliger Immunisierung mit SB824 (pST-TB) dargestellt. Auch hier zeigt sich eine deutliche Steigerung der CSP-spezifischen T-Zellantwort durch wiederholte Applikation der Bakterien. Durch Vergleich der ELISPOT-Daten mit den Pentamer-Färbungen ergibt sich, dass der Anteil der $IFN\gamma$ -Produzenten an der Gesamtzahl der CSP-spezifischen T-Zellen der einzelnen Mäuse zwischen 10% und 60% schwankt.

In keinem Experiment konnten CSP-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden, die die T_H2 -Zytokine IL-4 oder IL-10 sezernierten (Daten nicht gezeigt). Die durch die Salmonellen induzierte Immunantwort ist also T_H1 -basiert.

4.1.6 Memory-Antwort nach Immunisierung mit SB824 (pST-TB)

Neben der Aktivierung von Effektor-T-Zellen ist eine weitere wichtige Frage, ob eine Immunisierung eine Memory-Antwort induziert. Im folgenden Experiment wurden BALB/c-Mäuse dreimal mit SB824 (pST-TB) immunisiert. Nach 6 bzw. 14 Wochen wurde mittels $IFN\gamma$ -ELISPOT und Pentamer-Färbung die Zahl der CSP-spezifischen T-Zellen in Milz, Leber und Blut bestimmt und deren Phänotyp analysiert.

In Abb. 4.9-A ist das Ergebnis des $IFN\gamma$ -ELISPOT dargestellt. Die Zahl der CSP-spezifischen T-Zellen nimmt nach der sechsten Woche nach Immunisierung nur noch leicht ab. Die Zahl der CSP-spezifischen $IFN\gamma$ -Produzenten liegt drei Monate nach Immunisierung im Mittel immer noch bei ca. 500 sfu. Während die Zahl der CSP-spezifischen T-Zellen also relativ konstant bleibt, verändert sich hingegen der Phänotyp der Zellen. Wie in Abb. 4.9-B bis 4.9-D dargestellt, nimmt in allen Organen der Anteil der $CD62L$ hoch exprimierenden Memory-Zellen zu. $CD62L$ (L-Selectin) ist auf

Memory-T-Zellen unterschiedlich exprimiert. Die so genannten zentralen Memory-T-Zellen (T_{CM}), die sich vor allem in lymphatischen Organen finden, exprimieren CD62L hoch, wohingegen die so genannten Effektor-Memory-T-Zellen (T_{EM}), die sich vor allem in der Peripherie befinden, CD62L nur gering oder gar nicht exprimieren. Den beiden Memory-Zellpopulationen werden auch unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. T_{EM} können schnell Effektorfunktionen, wie die Sekretion von Zytokinen oder zytotoxische Aktivität, ausüben. T_{CM} sind vor allem durch eine starke IL-2-Produktion und Proliferation nach Antigen-Kontakt gekennzeichnet.

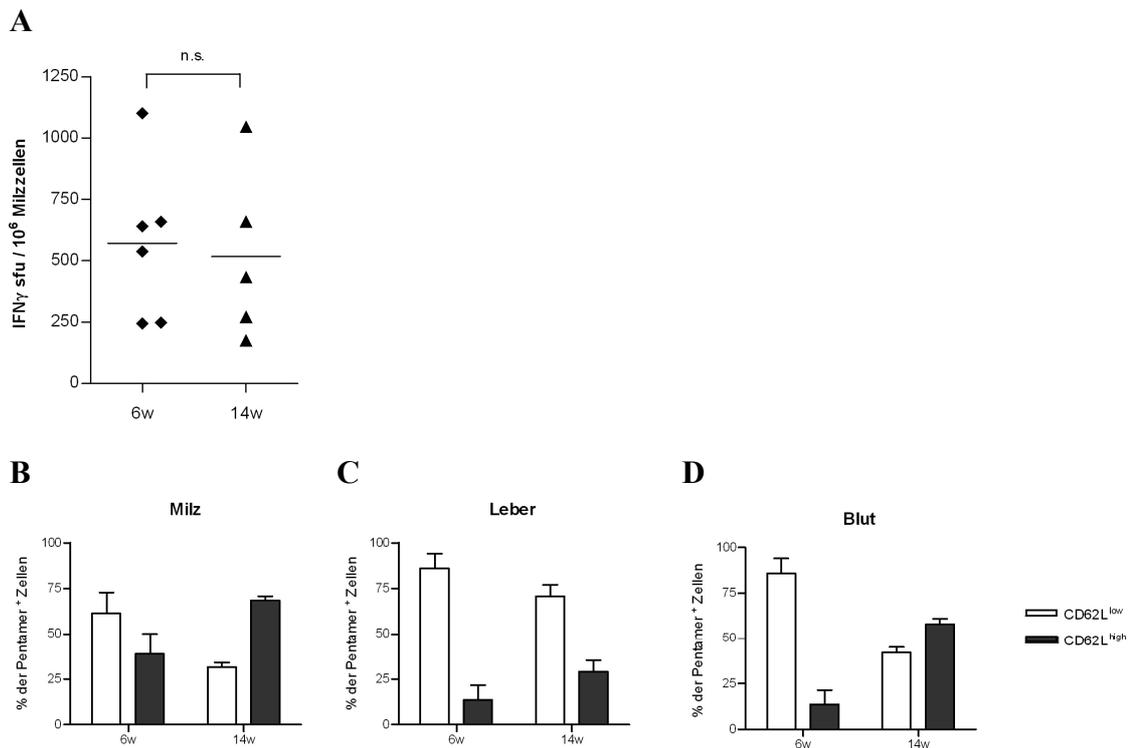


Abb. 4.9) Memory-T-Zellantwort nach Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB)

BALB/c-Mäuse wurden dreimal oral mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) immunisiert (Tag 0, 3 und 7). Nach sechs bzw. 14 Wochen wurden Milz- und Leberzellen isoliert und Blut abgenommen.

A) Die Zahl der IFN γ -produzierenden CSP-spezifischen T-Zellen wurde mittels IFN γ -ELISPOT bestimmt. Gezeigt ist die Zahl der IFN γ -produzierenden Zellen nach Stimulation mit dem CSP₂₄₅₋₂₅₃ Peptid. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten von je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet.

B) – D) Zellen aus Milz (B), Leber (C) und peripherem Blut (D) wurden mit einem H2-K^d / CSP₂₄₅₋₂₅₃-Pentamer sowie anti-CD8- und anti-CD62L-Antikörpern gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Gezeigt ist der Anteil von CD62L hoch- und niedrig-exprimierenden CSP-spezifischen, CD8⁺ T-Zellen sechs bzw. 14 Wochen nach Immunisierung. Die Balken repräsentieren den Mittelwert mit SEM aller Mäuse einer Gruppe (6w: n=3; 14w: n=5).

In allen Organen bilden zum Zeitpunkt sechs Wochen nach Immunisierung die CD62L niedrig exprimierenden CSP-spezifischen T-Zellen die größte Population, dabei handelt es sich also um Effektor- und Effektor-Memory-T-Zellen. Danach nimmt der Anteil der T_{CM} in allen Organen zu. Drei Monate nach Immunisierung bilden in der Milz die T_{CM} die größte Population. In der Leber hingegen überwiegen nach drei Monaten immer noch die T_{EM} . Im Blut halten sich beide Populationen etwa die Waage.

Es konnte also gezeigt werden, dass durch die Immunisierung mit den rekombinanten Salmonellen eine systemische Immunantwort induziert wird, in deren Folge es zur Ausbildung einer Memory-Antwort kommt.

4.1.7 Protektion nach Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB)

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Immunisierung mit den rekombinanten Salmonellen eine protektive Immunität, also einen Schutz gegen eine *P. berghei*-Infektion vermittelt. Dafür wurden BALB/c-Mäuse dreimal mit SB824 (pST-TB) oder dem Kontrollstamm SB824 (pHR241), der das Listerien-Antigen p60 als YopE-Fusionsmolekül exprimiert, immunisiert. Sechs Wochen nach Immunisierung wurden die Mäuse intravenös mit 1000 *P. berghei* Sporozoiten infiziert, und der Verlauf der Infektion wurde anhand von Blutaussstrichen verfolgt. In Abb. 4.10-A ist die Überlebensrate und -dauer der Tiere dargestellt. Abb. 4.10-B zeigt die Höhe der Parasitämie an Tag 12 nach Infektion.

Mäuse, bei denen Parasiten ins Blut gelangen, überleben die Infektion nicht. Bei der *P. berghei*-Infektion genügen vermutlich schon einige wenige infizierte Leberzellen, die Merozoiten ins Blut freisetzen, für einen lethalen Ausgang der Infektion. Dies ist ein Unterschied im Vergleich zur *P. falciparum*-Infektion des Menschen.

Das Experiment zeigt, dass die induzierte Immunantwort nicht ausreichend ist, um einen signifikanten Schutz vor einer *P. berghei*-Infektion zu vermitteln. Lediglich eine von fünf Mäusen, die mit dem Stamm SB824 (pST-TB) immunisiert wurden, entwickelte bis zum Ende des Experiments keine Parasitämie, d.h. der Eintritt der Parasiten in die Blutphase wurde verhindert. Die anderen Mäuse dieser Gruppe zeigten einen signifikant verlangsamten Anstieg der Parasitämien und eine etwas längere Überlebensdauer im Vergleich mit den nicht immunisierten Kontrollmäusen. Jedoch war dieser Effekt auch bei den Mäusen zu beobachten, die mit dem Kontrollstamm SB824 (pHR241) immunisiert worden waren. Man kann also davon ausgehen, dass zu dem verlangsamten

Verlauf der Infektion nicht nur die CSP-spezifische T-Zellantwort sondern auch eine unspezifische Aktivierung des angeborenen Immunsystems infolge der Salmonellen-Infektion beiträgt.

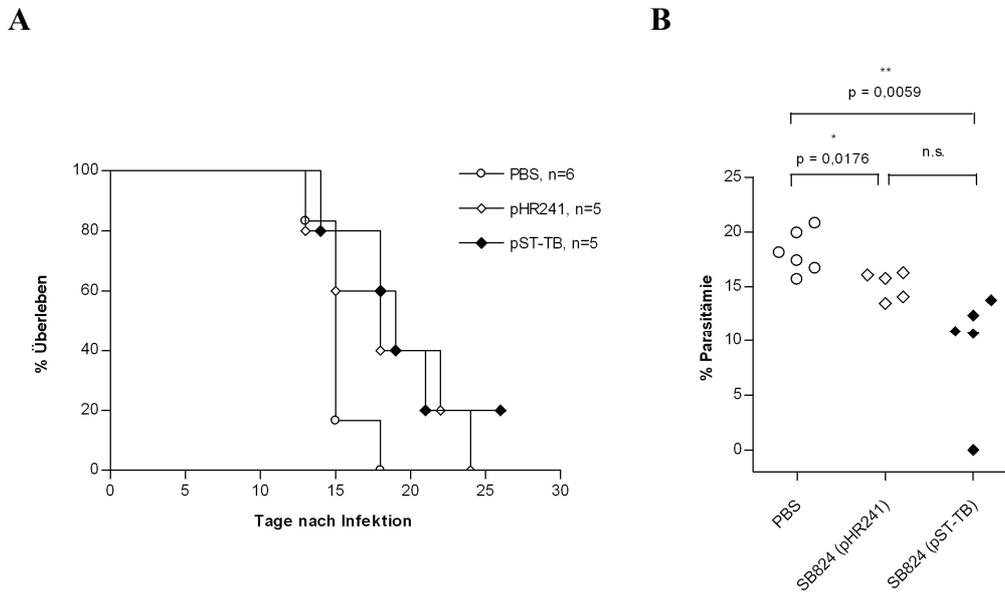


Abb. 4.10) Parasitämien nach Infektion mit *P. berghei* Sporozoiten

BALB/c-Mäuse wurden dreimal oral mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) oder dem Kontrollstamm SB824 (pHR241) immunisiert (Tag 0, 3 und 7). Eine Kontrollgruppe erhielt einmal oral 200µl PBS. Sechs Wochen nach Immunisierung wurden die Mäuse mit 1000 *P. berghei* Sporozoiten intravenös infiziert. Das Experiment wurde an Tag 26 p.i. beendet.

A) Dargestellt sind Überlebensdauer und Überlebensrate der Tiere nach *P. berghei*-Infektion.

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

B) Blutausstriche der infizierten Mäuse wurden gefärbt (Wright's stain), und die Zahl der infizierten Erythrozyten wurde bestimmt (Parasitämie = Zahl der infizierten Erythrozyten / Gesamtzahl der Erythrozyten). Dargestellt sind die Parasitämien der Mäuse an Tag 12 p.i. Gezeigt ist eines von zwei Experimenten.

4.2 Immunisierung mit der rekombinanten Adenylatcyclase ACT-CSP

Die *Bordetella pertussis* Adenylatcyclase (ACT) ist ein bakterielles Toxin, das seine katalytische Domäne in das Cytosol eukaryotischer Zellen, speziell CD11b/CD18 exprimierender antigenpräsentierender Zellen, translozieren kann. Aufgrund dieser Fähigkeit kann die Adenylatcyclase als Trägermolekül für Peptide genutzt werden, die in das MHC I-Kompartiment eingeschleust werden sollen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Verwendung des rekombinanten Adenylatcyclase-Fusionsmoleküls ACT-CSP zur Immunisierung gegen die Malaria-Infektion beschrieben. Die Klonierung und Aufreinigung des Moleküls wurde in der Gruppe von Dr. Peter Sebo (Institut für Mikrobiologie, Akademie der Wissenschaften der Tschechischen Republik, Prag, CZ) durchgeführt. In der Abb. 4.11 ist das Molekül schematisch dargestellt.

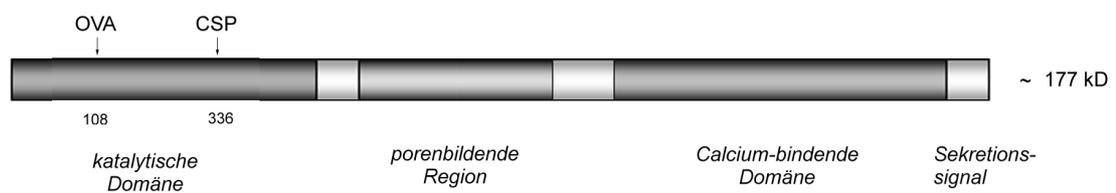


Abb. 4.11) Das *B. pertussis* Adenylatcyclase-Fusionsmolekül ACT-CSP

Die *Bordetella pertussis* Adenylatcyclase besteht aus drei funktionellen Domänen. Innerhalb der katalytischen Domäne wurden zwei verschiedene Peptidsequenzen eingefügt. Zwischen AS 107/108 wurde die Sequenz OVA₂₅₅₋₂₆₆, die das CD8-Epitop SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) des Ovalbumin enthält, sowie zwischen AS 335/336 die Sequenz CSP₂₃₉₋₂₅₉, die das CD8-Epitop SYIPSAEKI (CSP₂₄₅₋₂₅₃) enthält, eingeführt. Zudem wurde die katalytische Aktivität des Toxins durch die Aminosäureinsertion 188GlyPhe189 inhibiert.

In das Fusionsmolekül wurden zwei Peptide eingefügt, zum einen die Sequenz CSP₂₃₉₋₂₅₉ aus *P. berghei*, die das CD8-Epitop SYIPSAEKI (CSP₂₄₅₋₂₅₃) mit seinen flankierenden Sequenzen enthält, zum anderen die Sequenz OVA₂₅₅₋₂₆₆, die das CD8-Epitop SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) des Hühnerovalbumin enthält. Die Sequenzen wurden an den Positionen 336 und 108 innerhalb der katalytischen Domäne eingefügt. Zudem wurde die katalytische Aktivität des Toxins durch eine Insertion der Aminosäuren Glycin und Phenylalanin an Position 188/189 inhibiert. Das Fusionsmolekül wurde in *E. coli* exprimiert und über verschiedene Chromatographie-Verfahren gereinigt (Tartz et al., 2006). Im folgenden

Abschnitt der Arbeit sollen die *in vitro* Charakterisierung des Fusionsmoleküls und die Ergebnisse der Immunisierungen mit ACT-CSP beschrieben werden.

4.2.1 *In vitro* Charakterisierung des Fusionsmoleküls ACT-CSP

Zunächst sollte *in vitro* gezeigt werden, ob das ACT-CSP Fusionsmolekül biologisch aktiv ist, und ob die eingefügten Peptide in das Cytosol eukaryotischer Zellen transloziert und auf MHC I - Molekülen präsentiert werden. Dafür wurden das SIINFEKL-Epitop (OVA₂₅₇₋₂₆₄) des ACT-CSP und Milzzellen aus OT-1-Mäusen genutzt. Die CD8⁺ T-Zellen der OT-1-Maus tragen einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch das SIINFEKL-Peptid auf MHC I - Molekülen vom Haplotyp H2-K^b erkennt. OT-1 T-Zellen sollten sich also durch ACT-CSP aktivieren lassen, wenn das Peptid transloziert und korrekt prozessiert wird.

Im folgenden Experiment wurden Milzzellen aus einer naiven OT-1 Maus mit ACT-CSP inkubiert. Anschließend wurde die Proliferation der T-Zellen mittels ³H-Thymidin-Einbau (Abb. 4.12-A) und IFN γ -produzierende Zellen mittels ELISPOT (Abb. 4.12-B) detektiert.

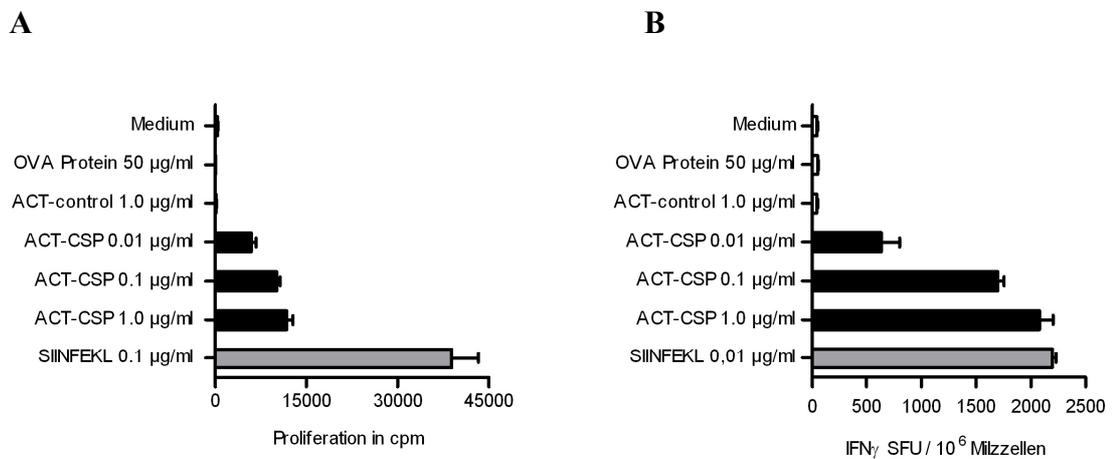


Abb. 4.12) *In vitro* Proliferation und IFN γ -Produktion von OT-1 T-Zellen

OT-1 Milzzellen wurden *in vitro* mit verschiedenen Mengen ACT-CSP sowie den angegebenen Mengen OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid, Ovalbumin und einem Kontroll-ACT-Fusionsmolekül stimuliert.

A) Nach 48 h wurde die Proliferation der Zellen durch den Einbau von ³H-Thymidin gemessen. Die Balken geben die Mittelwerte aus Triplikaten mit der SEM an.

B) Nach 18stündiger Inkubation wurde die Zahl der IFN γ -produzierenden Zellen im ELISPOT bestimmt. Die Balken geben die Mittelwerte aus Triplikaten mit der SEM an.

Gezeigt ist eines von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse aus Proliferationstest und IFN γ -ELISPOT zeigen, dass ACT-CSP biologisch aktiv ist und seine katalytische Domäne mit den eingefügten Peptiden in das Zytosol eukaryotischer Zellen transloziert. Die Stimulation von OT-1 Milzzellen mit dem Fusionsmolekül führt zur spezifischen Aktivierung von OT-1 T-Zellen, die daraufhin proliferieren und IFN γ sezernieren. Die Stärke der Aktivierung ist abhängig von der Konzentration des Fusionsmoleküls. Das Kontroll-Fusionsmolekül ACT-control, das nicht das SIINFEKL-Epitop enthält, führt nicht zu einer Aktivierung der OT-1 T-Zellen ebenso wie das Protein Ovalbumin, das nicht ins zytosolische Kompartiment gelangt. Der beobachtete Effekt ist also antigenspezifisch und abhängig von der Translokation des Antigens.

4.2.2 Immunisierung von C57Bl/6- und BALB/c-Mäusen mit ACT-CSP

Nachdem die Aktivität des Fusionsmoleküls *in vitro* demonstriert werden konnte, wurden nun C57Bl/6- und BALB/c-Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit ACT-CSP immunisiert. C57Bl/6-Mäuse besitzen MHC I – Moleküle vom Haplotyp H2-K^b, die das OVA₂₅₇₋₂₆₄ Epitop SIINFEKL präsentieren können. BALB/c-Mäuse haben hingegen MHC I – Moleküle vom Haplotyp H2-K^d, die das *P. berghei* CSP₂₄₅₋₂₅₃-Epitop SYIPSAEKI präsentieren können.

In Abb. 4.13-A ist die Zahl der OVA-spezifischen IFN γ -produzierenden Milzzellen sieben Tage nach einer Immunisierung von C57Bl/6-Mäusen mit 10 μ g ACT-CSP dargestellt. Es konnten OVA-spezifische IFN γ -Produzenten mit einer Frequenz von etwa 300 sfu nachgewiesen werden. Die Immunisierung mit dem Kontrollmolekül ACT-control, das die SIINFEKL-Sequenz nicht enthält, führte erwartungsgemäß nicht zu einer Induktion IFN γ -produzierender Zellen. In Abb. 4.13-B ist das Ergebnis einer Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit ACT-CSP dargestellt. Dabei wurden zwei Antigen Dosen miteinander verglichen und die Zahl der IFN γ -Produzenten bestimmt. Nach Immunisierung mit 10 μ g ACT-CSP lag die Zahl der CSP-spezifischen IFN γ -produzierenden Milzzellen bei etwa 400 sfu, nach Immunisierung mit 20 μ g bei etwa 600 sfu. Deshalb wurde für alle folgenden Experimente eine Antigen Dosis von 20 μ g gewählt. Diese Experimente haben gezeigt, dass das ACT-CSP-Fusionsmolekül auch *in vivo* eine immunogene Wirkung besitzt und eine Aktivierung sowohl OVA- als auch CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen induzieren kann.

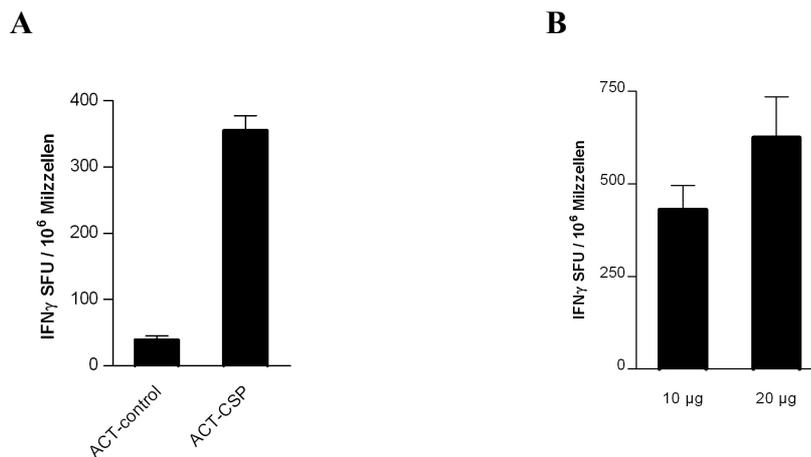


Abb. 4.13) Immunisierung von C57Bl/6- und BALB/c-Mäusen mit ACT-CSP

A) C57Bl/6-Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 10 μ g ACT-control oder 10 μ g ACT-CSP immunisiert. Sieben Tage nach Immunisierung wurden Milzzellen präpariert, und mittels eines ELISPOT wurde die Zahl der IFN γ -produzierenden Zellen bestimmt. Gezeigt ist die Zahl der IFN γ -produzierenden T-Zellen nach Stimulation mit dem OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid SIINFEKL. Die Balken geben den Mittelwert und SEM aller Mäuse einer Gruppe an (n = 3).

B) BALB/c-Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 10 oder 20 μ g ACT-CSP immunisiert. Sieben Tage nach Immunisierung wurden Milzzellen präpariert, und mittels eines ELISPOT wurde die Zahl der IFN γ -produzierenden Zellen bestimmt. Gezeigt ist die Zahl der IFN γ -produzierenden T-Zellen nach Stimulation mit dem CSP₂₄₅₋₂₅₃-Peptid SYIPSAEKI. Die Balken geben den Mittelwert und SEM aller Mäuse einer Gruppe an (n = 3).

4.2.3 Homologe *prime/boost*-Immunisierung mit ACT-CSP

Um die CSP-spezifische T-Zellantwort, die durch die Injektion von ACT-CSP induziert wird, weiter zu steigern, wurde die spezifische IFN γ -Produktion nach einer einmaligen primären Immunisierung (*prime*) mit der Antwort nach einer zweiten so genannten *boost*-Immunisierung mit ACT-CSP verglichen. Dabei wurden 20 μ g ACT-CSP zweimal im Abstand von 21 Tagen intraperitoneal injiziert. In Abb. 4.14 ist das Ergebnis des IFN γ -ELISPOT von Milzzellen immunisierter Mäuse dargestellt.

Hierbei wird deutlich, dass die wiederholte Injektion von ACT-CSP nicht zu einer Verstärkung der primären CSP-spezifischen T-Zellantwort führt. Auch eine dritte Immunisierung von ACT-CSP konnte die primäre T-Zellantwort nicht steigern (Daten nicht gezeigt).

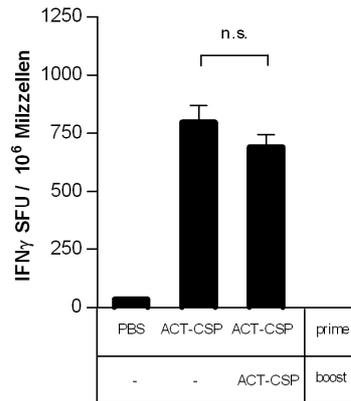


Abb. 4.14) Einmalige vs. zweimalige Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit ACT-CSP

BALB/c-Mäuse wurden einmal bzw. zweimal im Abstand von 21 Tagen intraperitoneal mit je 20 µg ACT-CSP immunisiert. Eine Kontrollgruppe erhielt lediglich einmal PBS intraperitoneal. Sieben Tage nach der primären oder der boost-Immunisierung wurden Milzzellen isoliert, und die Zahl der CSP-spezifischen IFN γ -produzierenden T-Zellen wurde im ELISPOT bestimmt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und SEM aller Mäuse einer Gruppe (n = 4). Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. Gezeigt ist eines von drei Experimenten.

Es ist bekannt, dass solche homologen *prime/boost* Immunisierungen oft sehr viel weniger effektiv sind als heterologe Immunisierungen, bei denen für die primäre und die sekundäre Immunisierung verschiedene Antigenträger verwendet werden. Mögliche Gründe dafür könnten sowohl die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen infolge der Immunisierung als auch eine verstärkte Expression von negativ-regulatorischen Molekülen auf den T-Zellen sein, die die T-Zellaktivierung inhibieren.

4.2.4 Blockade von CTLA-4 während der Immunisierung mit ACT-CSP

Um zu testen, ob negative Costimulatoren wie CTLA-4 (CD152, *cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4*) die weitere Aktivierung der T-Zellen verhindern, wurde ein blockierender Antikörper gegen CTLA-4 in Kombination mit der ACT-CSP-Immunisierung eingesetzt. CTLA-4 ist ein negativ-costimulatorisches Molekül, das auf aktivierten T-Zellen zu deren Abschaltung beiträgt und zudem auf regulatorischen T-Zellen konstitutiv exprimiert wird. Der monoklonale anti-CTLA-4 Antikörper 4F10 bindet CTLA-4, ohne aktivatorisch zu wirken, und verhindert die Bindung der Liganden CD80 und CD86. Der Effekt dieses blockierenden Antikörpers wurde sowohl während der primären als auch während der Zweitimmunisierung untersucht.

In Abb. 4.15 ist die primäre Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit ACT-CSP mit und ohne CTLA-4-Blockade gezeigt. Dabei wurde der Antikörper 24 Stunden vor der Immunisierung intraperitoneal injiziert.

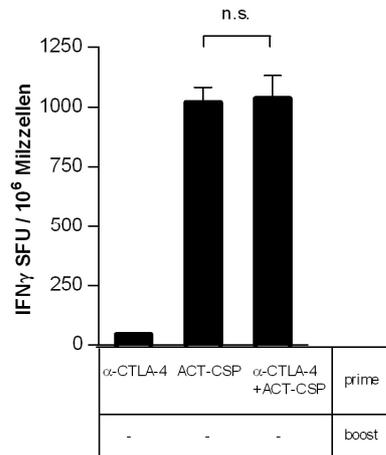


Abb. 4.15) CTLA-4-Blockade während der primären Immunisierung mit ACT-CSP

BALB/c-Mäuse wurden einmal mit 20 µg ACT-CSP intraperitoneal immunisiert. Eine Gruppe von Mäusen erhielt zusätzlich einen Tag vor Immunisierung 500 µg anti-CTLA-4 Antikörper (4F10) intraperitoneal. Eine Kontrollgruppe erhielt lediglich den Antikörper. Sieben Tage nach Immunisierung wurden Milzzellen isoliert, und die Zahl der CSP-spezifischen IFN γ -produzierenden T-Zellen wurde im ELISPOT bestimmt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und SEM aller Mäuse einer Gruppe (n = 3). Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. Gezeigt ist eines von zwei Experimenten.

Das Experiment zeigt, dass die Blockade der Interaktion von CTLA-4 mit seinem Liganden während der primären Immunisierung keine Auswirkung auf die Zahl der IFN γ -produzierenden CSP-spezifischen T-Zellen hat. Die Gabe des Antikörpers allein führt nicht zu einer unspezifischen T-Zellantwort.

In Abb. 4.16 ist der Effekt der CTLA-4-Blockade während der zweiten Immunisierung mit ACT-CSP dargestellt. In diesem Experiment wurde der anti-CTLA-4-Antikörper einen Tag vor der Sekundärimmunisierung injiziert.

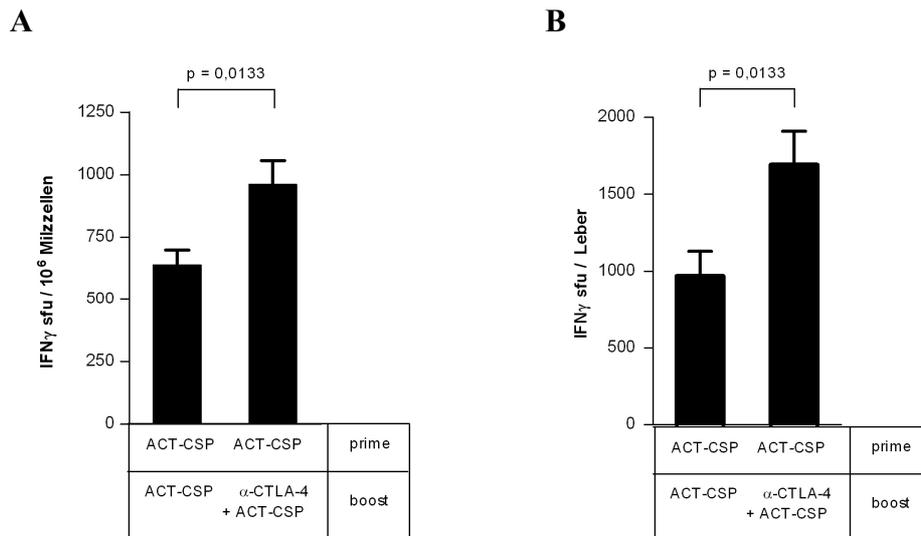


Abb. 4.16) CTLA-4-Blockade während der Zweitimmunisierung mit ACT-CSP

BALB/c-Mäuse wurden zweimal mit je 20 µg ACT-CSP intraperitoneal immunisiert. Eine Gruppe erhielt zusätzlich einen Tag vor der zweiten Immunisierung 500 µg anti-CTLA-4-Antikörper (4F10) intraperitoneal. Sieben Tage nach Immunisierung wurden Milz- (A) und Leberzellen (B) isoliert, und die Zahl der CSP-spezifischen IFN γ -produzierenden T-Zellen wurde mittels ELISPOT bestimmt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und SEM aller Mäuse einer Gruppe. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von 3 Experimenten (n = 9).

Im Gegensatz zur CTLA-4-Blockade während der primären Immunisierung führt die Blockade von CTLA-4 während der zweiten Immunisierung zu einer signifikanten Steigerung der Zahl der CSP-spezifischen IFN γ -produzierenden T-Zellen. In Abb. 4.16-B ist das Ergebnis eines IFN γ -ELISPOTs von Leberzellen dargestellt. Die durch die Immunisierung mit ACT-CSP induzierten Effektor-T-Zellen finden sich auch in der Leber, dem Zielorgan der Sporoziten, wieder. Dabei ist der Effekt der CTLA-4-Blockade in der Leber ebenso ausgeprägt wie in der Milz.

Um neben den IFN γ -produzierenden T-Zellen auch antigenspezifische T-Zellen mit anderen Effektorfunktionen nachweisen zu können, wurde die bereits in Abschnitt 4.1.5 beschriebene Technik der Pentamer-Färbung angewendet. In Abb. 4.17-A sind Beispielfärbungen von Zellen aus Milz, Leber und Blut einer naiven und einer einmal immunisierten Maus mit dem H2-K^d / CSP₂₄₅₋₂₅₃ - Pentamer sowie anti-CD8 und anti-CD62L gezeigt.

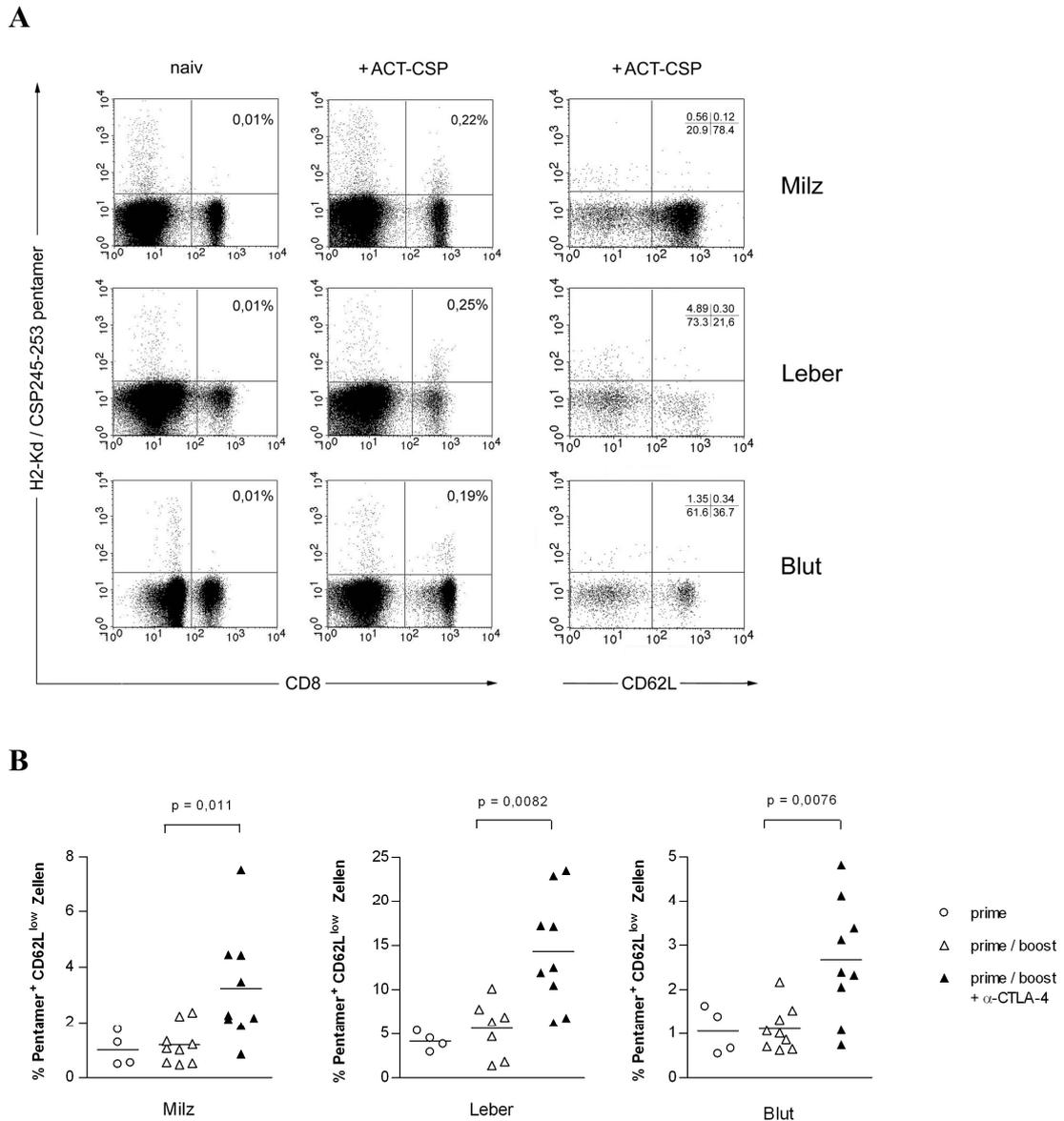


Abb. 4.17) Zahl der CSP-spezifischen T-Zellen in Milz, Leber und Blut von immunisierten Mäusen

BALB/c-Mäuse wurden einmal (*prime*) oder zweimal (*prime/boost*) im Abstand von 21 Tagen mit 20 μ g ACT-CSP immunisiert. Eine Gruppe erhielt einen Tag vor der Zweitimmunisierung 500 μ g anti-CTLA-4-Antikörper. Sieben Tage nach Immunisierung wurden Milz- und Leberzellen sowie Zellen aus dem peripheren Blut aufgereinigt und mit einem H2-K^d/CSP₂₄₅₋₂₅₃-Pentamer sowie anti-CD8- und anti-CD62L-Antikörpern gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert.

A) Gezeigt sind Beispielfärbungen von Zellen aus einer naiven und einer einmal immunisierten Maus. Die linken sechs Diagramme zeigen die Pentamer/CD8-Färbung von Gesamtlymphozyten. Der Hintergrund an Pentamer⁺ Zellen in der CD8⁻ Population wird v.a. durch B-Zellen verursacht (Daten nicht gezeigt). Die drei rechten Diagramme zeigen die CD62L/Pentamer-Färbung von CD8⁺ Zellen.

B) Die Diagramme fassen die Frequenzen von CSP-spezifischen CD62L niedrig exprimierenden CD8⁺ T-Zellen in Milz, Leber und Blut der immunisierten Mäuse zusammen. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus, die Querbalken geben die Mittelwerte aller Messwerte einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet.

In Abb. 4.17-B sind die Frequenzen der aktivierten CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (CD62L^{low}) in Milz, Leber und Blut zusammengefasst. Dabei zeigt sich, dass die einmalige Injektion von ACT-CSP bereits eine systemische CSP-spezifische T-Zellantwort induziert, die durch eine zweite Immunisierung nicht verstärkt wird. Die Blockade von CTLA-4 während der Zweitimmunisierung führt hingegen zu einer signifikanten Steigerung der Zahl der CSP-spezifischen T-Zellen in Milz, Leber und Blut. Durch Vergleich der ELISPOT-Daten mit den Pentamer-Färbungen zeigt sich auch hier, dass der Anteil der IFN γ -Produzenten an der Gesamtzahl der CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen der einzelnen Mäuse sehr stark schwankt.

Sowohl nach Immunisierung mit ACT-CSP und anti-CTLA-4 als auch ohne CTLA-4-Blockade konnten keine CSP-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden, die die T_H2-Zytokine IL-4 und IL-10 produzierten (Daten nicht gezeigt). Die induzierte Immunantwort ist also T_H1-polarisiert.

4.2.5 Memory-Antwort nach Immunisierung mit ACT-CSP und anti-CTLA-4

Ebenso wichtig wie Zahl und Phänotyp der aktivierten Effektor-T-Zellen infolge einer Immunisierung ist die Frage, ob eine Memory-T-Zellantwort generiert wurde. Um dieser Frage nachzugehen, wurden BALB/c-Mäuse zweimal mit ACT-CSP immunisiert, wobei eine Gruppe anti-CTLA-4 während der Zweitimmunisierung erhielt. Anschließend wurde nach sieben Tagen und nach 12 Wochen die CSP-spezifische Immunantwort in Milz und Leber analysiert.

In Abb. 4.18-A sind die Ergebnisse der IFN γ -ELISPOT-Messungen der Milzzellen nach einer und nach 12 Wochen dargestellt. Dabei zeigt sich in beiden Gruppen erwartungsgemäß eine verminderte Zahl IFN γ -produzierender CSP-spezifischer T-Zellen nach 12 Wochen. Diese so genannte Kontraktion der Effektor-T-Zellen fällt allerdings in der Gruppe ohne anti-CTLA-4 stärker aus. Der Unterschied in der Zahl der CSP-spezifischen IFN γ -produzierenden T-Zellen beider Gruppen ist auch nach 12 Wochen noch signifikant.

In Abb. 4.18-B und -C sind die Frequenzen der CSP-spezifischen T-Zellen in Milz und Leber nach sieben Tagen und nach 12 Wochen gezeigt. Interessanterweise nimmt die Zahl der CSP-spezifischen T-Zellen v.a. in der Leber nur geringfügig ab. Auch in Bezug auf die Gesamtzahl der CSP-spezifischen T-Zellen besteht nach 12 Wochen immer noch ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Der Effekt der CTLA-4-

Blockade während der Zweitimmunisierung führt also nicht nur zu einer kurzfristigen verstärkten Aktivierung von T-Zellen, sondern bleibt langfristig bestehen.

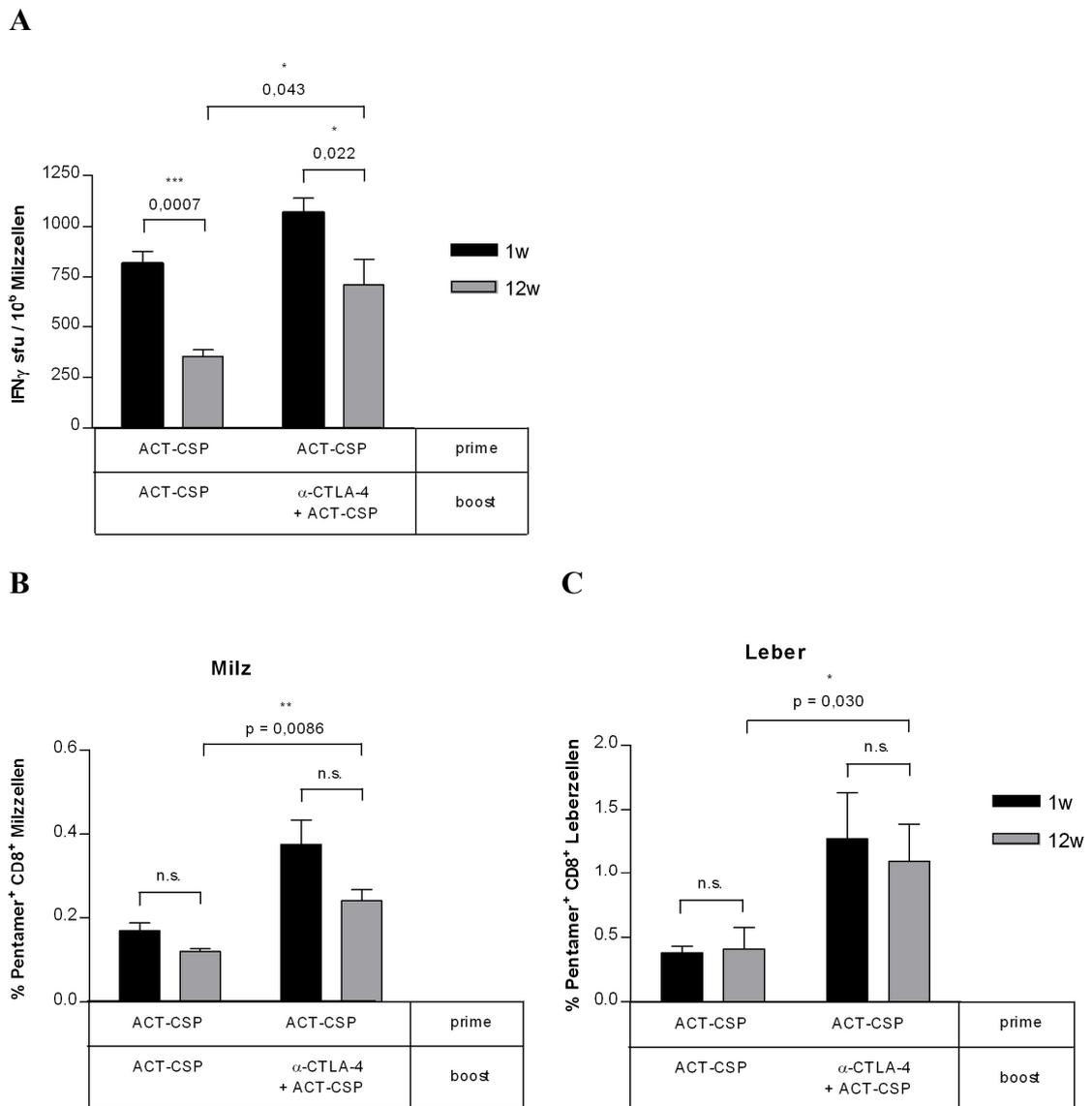


Abb. 4.18) CSP-spezifische T-Zellen 12 Wochen nach Immunisierung

BALB/c-Mäuse wurden zweimal im Abstand von 21 Tagen mit 20 µg ACT-CSP intraperitoneal immunisiert. Eine Gruppe erhielt zusätzlich i.p. 500 µg anti-CTLA-4-Antikörper einen Tag vor der Zweitimmunisierung. Sieben Tage oder 12 Wochen nach Immunisierung wurden Milz- und Leberzellen isoliert.

A) Die Zahl der CSP-spezifischen IFN γ -produzierenden T-Zellen in der Milz wurde mittels ELISPOT bestimmt. Die Gesamtzahl der CSP-spezifischen T-Zellen in Milz (**B**) und Leber (**C**) wurde durch Färbung der Zellen mit einem H2-K^d/ CSP 245-253 –Pentamer sowie einem anti-CD8-Antikörper und anschließender durchflußzytometrischer Analyse ermittelt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert mit SEM aller Mäuse einer Gruppe (n = 5). Die Signifikanz wurde mit dem Student’s t-Test ermittelt.

Memory-T-Zellen werden anhand ihrer CD62L-Expression in zentrale (T_{CM} , $CD62L^{high}$) und Effektor-Memory-T-Zellen (T_{EM} , $CD62L^{low}$) unterschieden. In Abb. 4.19-A und -B ist das Verhältnis der CD62L hoch- und niedrig-exprimierenden CSP-spezifischen T-Zellen in Milz und Leber sieben Tage und 12 Wochen nach Immunisierung dargestellt.

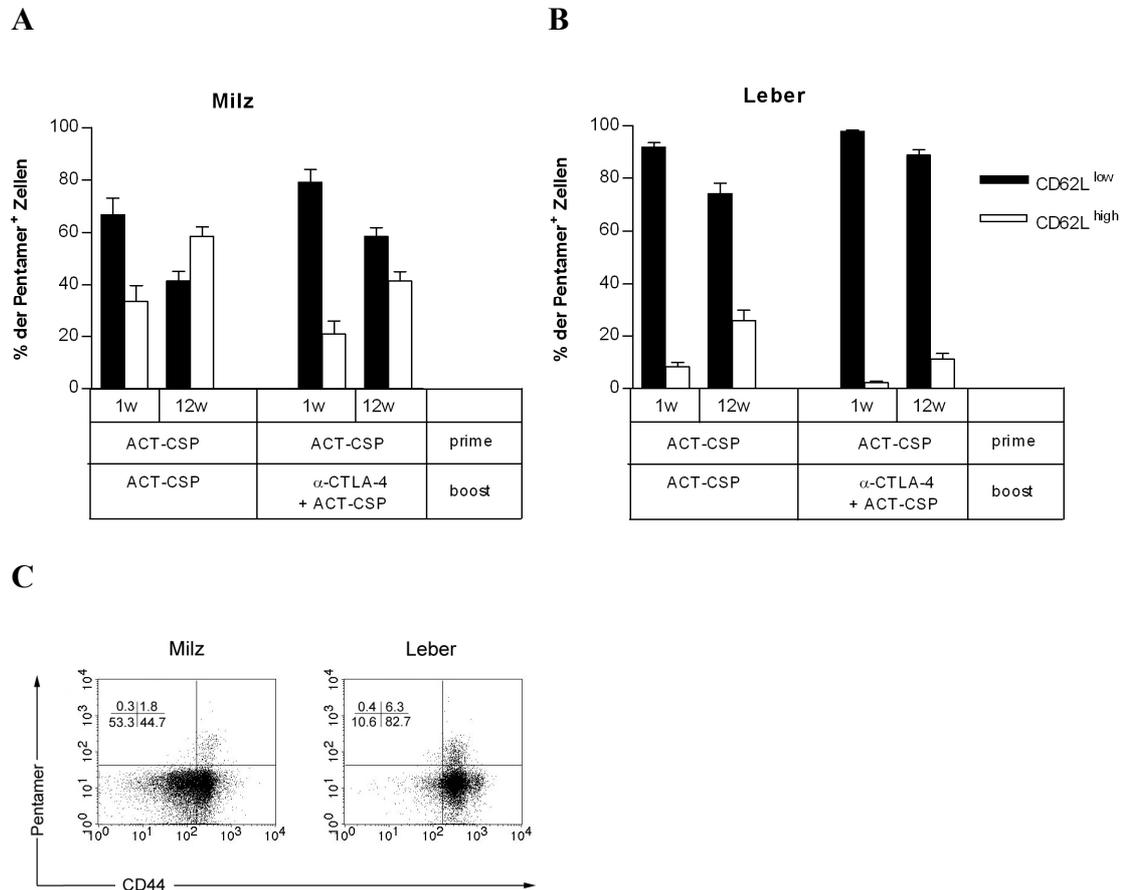


Abb. 4.19) Phänotyp der CSP-spezifischen T-Zellen nach ACT-CSP-Immunisierung

BALB/c-Mäuse wurden zweimal im Abstand von 21 Tagen mit 20 µg ACT-CSP intraperitoneal immunisiert. Eine Gruppe erhielt zusätzlich i.p. 500 µg anti-CTLA-4-Antikörper einen Tag vor der Zweitimmunisierung. Sieben Tage oder 12 Wochen nach Immunisierung wurden Milz- und Leberzellen isoliert. Die Zellen wurden mit einem H2-K^d/CSP₂₄₅₋₂₅₃-Pentamer sowie anti-CD8-, anti-CD62L- und anti-CD44-Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

A) – B) Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Pentamer⁺ CD8⁺ T-Zellen, die CD62L hoch (weiße Balken) oder niedrig (schwarze Balken) exprimieren. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte mit SEM aller Mäuse einer Gruppe (n = 5). Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test ermittelt.

C) CD44-Expression der Pentamer⁺ CD8⁺ T-Zellen 12 Wochen nach Immunisierung. Gezeigt sind zwei repräsentative Färbungen von Milz- und Leberzellen.

Eine Woche nach Immunisierung finden sich in beiden Gruppen sowohl in der Milz als auch in der Leber überwiegend CD62L niedrig-exprimierende T-Effektor-Zellen. Nach 12 Wochen hat jedoch der Anteil der CD62L hoch-exprimierenden zentralen Memory-T-Zellen in beiden Organen zugenommen. In der Gruppe, die ohne anti-CTLA-4 immunisiert wurde, bilden die T_{CM} in der Milz erwartungsgemäß die Mehrheit, während in der Leber die T_{EM} deutlich überwiegen. Dies entspricht dem gängigen Modell der Memory-T-Zellen, wonach T_{CM} v.a. in lymphatischen Organen und T_{EM} v.a. in der Peripherie zu finden sind. Bei den Mäusen, die in Anwesenheit von anti-CTLA-4 immunisiert wurden, bietet sich in der Milz jedoch ein anderes Bild. Hier bilden nach 12 Wochen die T_{EM} in der Milz die überwiegende Memory-T-Zellpopulation. Auch in der Leber ist der Anteil der T_{EM} größer als bei den Mäusen, die ohne anti-CTLA-4 immunisiert wurden. Das bedeutet, dass 12 Wochen nach Immunisierung die CSP-spezifischen T-Zellen beider Gruppen einen unterschiedlichen Phänotyp aufweisen. Ob dies lediglich an einer verlängerten Aktivierung der T-Zellen liegt, oder ob die Blockade von CTLA-4 generell zu einem größeren Anteil der Effektor-Memory-T-Zellen führt, kann hier nicht beantwortet werden. Dafür müsste man die Memory-Antwort zu einem späteren Zeitpunkt erneut analysieren.

In Abb. 4.19-C schließlich ist anhand von Beispielfärbungen gezeigt, dass die CSP-spezifischen T-Zellen 12 Wochen nach Immunisierung den Hyaluronsäurerezeptor CD44 exprimieren. Dabei handelt es sich um ein Zelladhäsionsmolekül, das verstärkt auf Effektor- und Memory-T-Zellen exprimiert wird. Die durch ACT-CSP induzierten CSP-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen weisen demnach einen für Effektor- und Memory-Zellen charakteristischen Phänotyp auf.

4.2.6 Protektion nach Immunisierung mit ACT-CSP und anti-CTLA-4

Schließlich sollte untersucht werden, ob eine Immunisierung mit ACT-CSP oder die Kombination von ACT-CSP mit anti-CTLA-4 eine protektive Immunantwort induziert, also einen Schutz gegen eine Sporoziten-Infektion vermittelt. Dafür wurden BALB/c-Mäuse zweimal mit ACT-CSP immunisiert oder mit ACT-CSP und anti-CTLA-4 bei der Zweitimmunisierung. Sieben Tage oder 12 Wochen nach Immunisierung wurden die Mäuse intravenös mit je 1000 *P. berghei* Sporoziten infiziert. Der Verlauf der Infektion wurde anhand von Blutaussstrichen verfolgt. Tiere, die 14 Tage nach Infektion noch keine Parasiten im Blut aufwiesen, entwickelten auch später keine Parasitämie mehr und galten

als geschützt, wohingegen Tiere, die eine Parasitämie im Blut entwickelten, an der Infektion verstarben. In Tab. 4.2 sind die Ergebnisse aus vier Infektions-Experimenten zusammengefasst.

Tab. 4.2) Plasmodium berghei-Infektion immunisierter Mäuse

BALB/c-Mäuse wurden zweimal im Abstand von 21 Tagen mit 20 µg ACT-CSP intraperitoneal immunisiert. Eine Gruppe erhielt zusätzlich i.p. 500 µg anti-CTLA-4-Antikörper einen Tag vor der Zweitimmunisierung. Einige Kontrolltiere erhielten lediglich PBS oder 500 µg anti-CTLA-4 i.p. Sieben Tage oder 12 Wochen nach Immunisierung wurden die Tiere intravenös mit 1000 *P. berghei* Sporozoiten infiziert. Die Parasitämie wurde anhand von Blutaussstrichen kontrolliert. Tiere, die 14 Tage nach Infektion keine Parasiten im Blut aufwiesen, galten als geschützt.

Immunisierung		Zahl der infizierten Tiere / Gesamtzahl	% Schutz
prime	boost		
Infektion nach sieben Tagen:			
-	PBS	15/15	0%
-	α-CTLA-4	5/5	0%
ACT-CSP	ACT-CSP	9/9	0%
ACT-CSP	α-CTLA-4 + ACT-CSP	5/15	67%
Infektion nach 12 Wochen:			
ACT-CSP	α-CTLA-4 + ACT-CSP	5/6	17%

Die homologe *prime/boost*-Immunisierung mit ACT-CSP induziert keine ausreichende Immunantwort, alle Mäuse dieser Gruppe erkrankten. In Abb. 4.20 ist die Höhe der Parasitämien der Mäuse an Tag 9 und Tag 13 nach Infektion dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die Mäuse, die nur mit ACT-CSP immunisiert wurden, ähnliche Parasitämien entwickelten wie die Kontrollmäuse, die nur PBS bekommen hatten. Die Kombination jedoch der ACT-CSP-Immunisierung mit der Blockade von CTLA-4 während der Zweitimmunisierung führte zu einem Schutz von fast 70% der immunisierten Mäuse. Die übrigen Mäuse dieser Gruppe entwickelten ähnliche Parasitämien wie die Kontrollmäuse. Um zu überprüfen, ob die Induktion von Memory-T-Zellen einen vergleichbaren Schutz vermitteln kann, wurde eine Gruppe von Mäusen, die mit ACT-CSP und anti-CTLA-4 immunisiert worden war, 12 Wochen nach der Immunisierung mit Sporozoiten infiziert. Jedoch war hier nur noch eine von sechs Mäusen geschützt. Die durch die Immunisierung

induzierte protektive Immunität ist also nur kurzlebig. Die Gabe von anti-CTLA-4 allein hatte keinen Einfluss auf die Infektion.

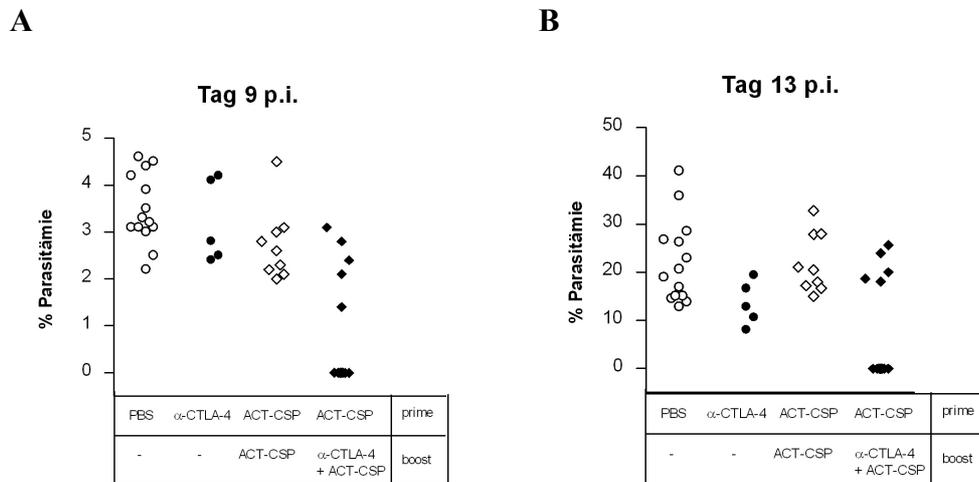


Abb. 4.20) Parasitämien der immunisierten Mäuse nach Infektion mit *P. berghei*-Sporozoiten

BALB/c-Mäuse wurden zweimal im Abstand von 21 Tagen mit 20 μ g ACT-CSP intraperitoneal immunisiert. Eine Gruppe erhielt zusätzlich i.p. 500 μ g anti-CTLA-4-Antikörper einen Tag vor der Zweitimmunisierung. Einige Kontrolltiere erhielten lediglich PBS oder 500 μ g anti-CTLA-4 i.p. Sieben Tage nach Immunisierung wurden die Tiere intravenös mit 1000 *P. berghei* Sporozoiten infiziert. Die Parasitämie wurde anhand von Blutausstrichen an Tag 9 (**A**) und Tag 13 (**B**) p.i. kontrolliert. Die Blutausstriche wurden mit Wright's stain - Lösung gefärbt, und die Zahl der infizierten Erythrozyten wurde bestimmt (Parasitämie = Zahl der infizierten Erythrozyten / Gesamtzahl der Erythrozyten). Jeder Messwert repräsentiert eine Maus.

4.2.7 Nachweis Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen nach Immunisierung

In der Literatur ist beschrieben worden, dass infolge von Immunisierungen auch regulatorische T-Zellen aktiviert werden (Kursar et al., 2004), die der Aktivierung und einer weiteren Expansion der Effektor-T-Zellen bei einer Zweitimmunisierung entgegen wirken. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass bei der homologen *prime/boost*-Immunisierung mit ACT-CSP keine Steigerung der CSP-spezifischen T-Zellantwort induziert werden konnte. Da regulatorische T-Zellen zudem CTLA-4 konstitutiv exprimieren, könnte der Effekt der Blockade von CTLA-4 bei der Zweitimmunisierung mit einer Inhibition der regulatorischen T-Zellen erklärt werden.

Um zu überprüfen, ob es infolge der Immunisierung mit ACT-CSP zu einer Zunahme der Zahl der regulatorischen T-Zellen kommt, wurden Mäuse ein- oder zweimal mit ACT-

CSP immunisiert. Anschließend wurden Zellen aus Milz und Leber der immunisierten Mäuse sowie von naiven Kontrollmäusen mit anti-CD4 und einem anti-Foxp3-Antikörper gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Foxp3 ist ein Transkriptionsfaktor, der spezifisch in regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und bei der Ausbildung des regulatorischen Phänotyps eine zentrale Rolle spielt. Der in der Vergangenheit häufig zur Detektion von regulatorischen T-Zellen verwendete Marker CD25 (IL2-Rezeptor-Kette α) ist hingegen nur bedingt zum Nachweis von regulatorischen T-Zellen geeignet, da CD25 auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird.

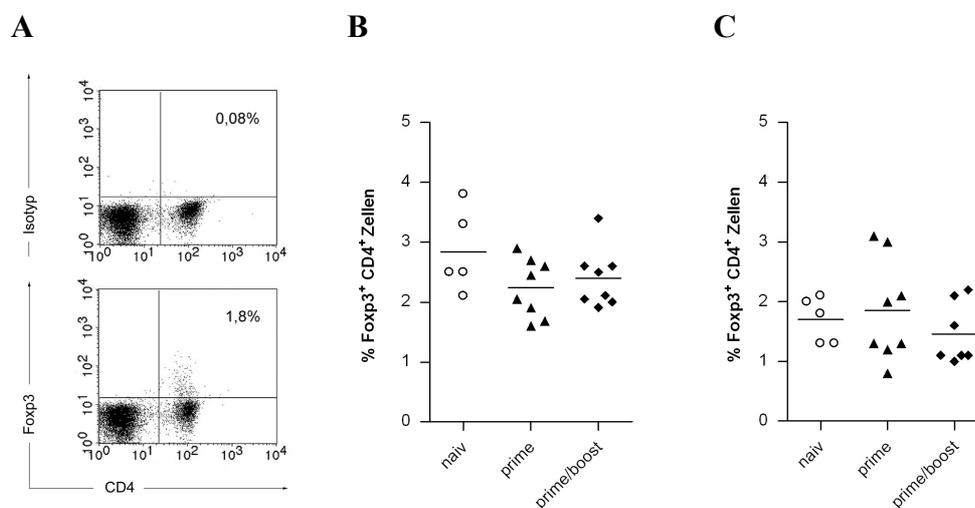


Abb. 4.21) Nachweis von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen

BALB/c-Mäuse wurden einmal oder zweimal im Abstand von 21 Tagen mit 20 μ g ACT-CSP intraperitoneal immunisiert. Sieben Tage nach Immunisierung wurden Milz- und Leberzellen der immunisierten Mäuse sowie von naiven Kontrollmäusen isoliert, mit einem anti-CD4- sowie anti-Foxp3-Antikörper gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert.

A) Gezeigt sind Beispielfärbungen von Lymphozyten aus der Milz mit anti-CD4 und einem Ratte-IgG2a-Isotyp-Antikörper (oberes Diagramm) sowie anti-CD4 und anti-Foxp3 (unteres Diagramm).

B) - C) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Foxp3⁺ CD4⁺ regulatorischen T-Zellen an der Lymphozytenpopulation in Milz (B) und Leber (C) nach einmaliger (*prime*) oder wiederholter (*boost*) Immunisierung mit ACT-CSP. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe an.

Abb. 4.21 zeigt den Nachweis von Foxp3⁺ T-Zellen in Milz und Leber nach Immunisierung mit ACT-CSP. Dabei wird deutlich, dass es infolge der Immunisierung weder in der Milz noch in der Leber zu einer Zunahme der CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen

T-Zellen kommt. Dies schließt jedoch nicht aus, dass regulatorische T-Zellen während der Immunisierung aktiviert werden und der weiteren Expansion der Effektor-T-Zellen entgegenwirken, ohne dass sich ihre Anzahl messbar ändert.

4.3 Heterologe *prime/boost*-Immunisierungen

Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass heterologe *prime/boost*-Immunisierungen, bei denen zwei verschiedene Antigenträgersysteme zum Einsatz kommen, wesentlich erfolgreicher sind als homologe *prime/boost*-Immunisierungen (Schneider et al., 1998; Gilbert et al., 2002). Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass eine homologe *prime/boost*-Immunisierung mit ACT-CSP die primäre CSP-spezifische T-Zellantwort nicht steigern kann. Deshalb sollte schließlich im dritten Teil der Arbeit eine Kombination der beiden hier vorgestellten Antigenträger getestet werden. In Abb. 4.22 sind die beiden möglichen Immunisierungsschemen dargestellt.

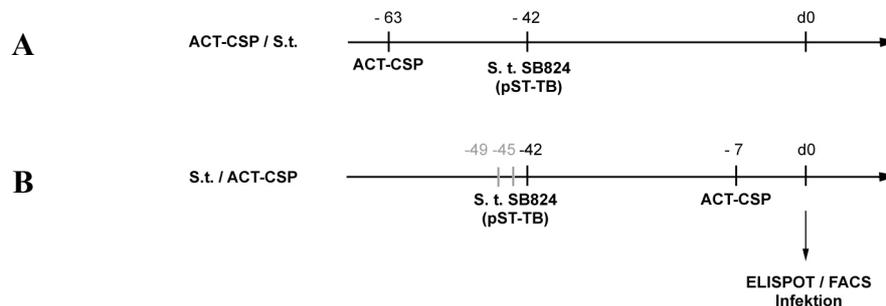


Abb. 4.22) Schema der heterologen *prime/boost*-Immunisierung

BALB/c-Mäuse wurden mit dem Salmonellen-Stamm *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) und dem Adenylatcyclase-Konstrukt ACT-CSP immunisiert.

A) ACT-CSP / *S.t.*: Die Mäuse erhielten als Primärimmunisierung 20 µg ACT-CSP intraperitoneal und 21 Tage später oral 5×10^8 Salmonellen. Nach sechs Wochen wurden die Mäuse mit *P. berghei* infiziert oder Milz und Leber wurden für *ex vivo* Analysen entnommen.

B) *S.t.* / ACT-CSP: Die Mäuse erhielten als Primärimmunisierung ein- oder dreimal oral 5×10^8 Salmonellen und fünf Wochen später 20 µg ACT-CSP intraperitoneal. Nach sieben Tagen wurden die Mäuse mit *P. berghei* infiziert oder Milz und Leber wurden für *ex vivo* Analysen entnommen.

S.t. = *Salmonella typhimurium*

4.3.1 Analyse der T-Zellantwort nach heterologer *prime/boost* Immunisierung

Um zu untersuchen, welche der beiden möglichen Kombinationen die beste T-Zellantwort erzeugt, wurden BALB/c-Mäuse entsprechend der Immunisierungsschemen in Abb. 4.22 immunisiert. Zudem wurden Mäuse einmal mit ACT-CSP oder dreimal mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) wie in den Kapiteln 4.1 und 4.2 beschrieben immunisiert. In Abb. 4.23 sind die Ergebnisse der IFN γ -ELISPOT-Messungen von Milz- und Leberzellen dargestellt.

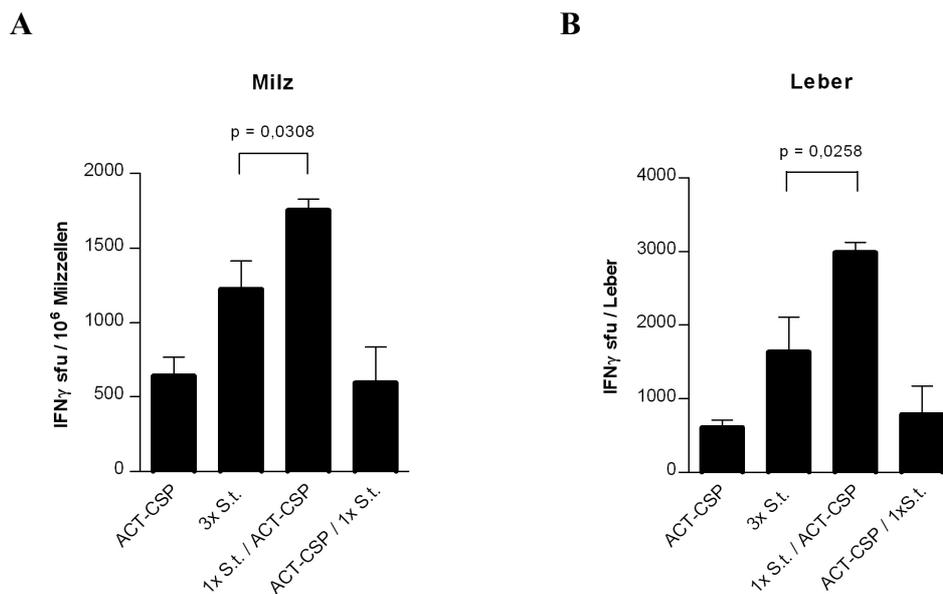


Abb. 4.23) IFN γ -Produktion nach Immunisierung mit *S. t. SB824* (pST-TB) und ACT-CSP

BALB/c-Mäuse wurden wie folgt immunisiert. **ACT-CSP:** Die Mäuse erhielten eine i.p. Injektion von 20 μ g ACT-CSP. Nach sieben Tagen wurden Milz- und Leberzellen isoliert. **3x S.t.:** Die Mäuse erhielten oral dreimal im Abstand von drei Tagen je 5×10^8 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB). Nach sechs Wochen wurden Milz- und Leberzellen isoliert. **1x S.t. / ACT-CSP:** Die Mäuse erhielten einmal oral 5×10^8 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) und nach fünf Wochen eine i.p. Injektion von 20 μ g ACT-CSP. Nach weiteren sieben Tagen wurden Milz- und Leberzellen isoliert. **ACT-CSP / 1x S.t.:** Die Mäuse erhielten eine i.p. Injektion von 20 μ g ACT-CSP und nach 21 Tagen oral je 5×10^8 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB). Nach weiteren sechs Wochen wurden Milz- und Leberzellen isoliert.

Die Entnahme der Organe erfolgte für alle Mäuse am gleichen Tag. Die Milz- und Leberzellen wurden in einem IFN γ -ELISPOT eingesetzt. Dargestellt ist die Zahl der IFN γ -produzierenden T-Zellen in Milz (**A**) und Leber (**B**) nach Stimulation mit dem CSP₂₄₅₋₂₅₃-Peptid. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte mit SEM aller Mäuse einer Gruppe. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet.

Dabei zeigt sich, dass eine Primärimmunisierung mit Salmonellen gefolgt von einer zweiten Immunisierung mit ACT-CSP eine signifikant bessere T-Zellantwort als beide Immunisierungen einzeln erzeugt. Die Zahl der CSP-spezifischen IFN γ -produzierenden T-Zellen liegt bei etwa 1750 sfu in der Milz und 3000 sfu in der Leber. Interessanterweise führt die umgekehrte Reihenfolge der Immunisierung – Primärimmunisierung mit ACT-CSP gefolgt von einer zweiten Immunisierung mit Salmonellen – zu keiner Steigerung der primären, durch die Immunisierung mit ACT-CSP induzierten, T-Zellantwort. Sie liegt lediglich bei 600 sfu in der Milz und 900 sfu in der Leber. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die primäre CSP-spezifische T-Zellantwort zu einer noch schnelleren Beseitigung der Salmonellen bzw. von Salmonellen-infizierten Makrophagen in den Mäusen führt, so dass deren Persistenz noch stärker beeinträchtigt wird.

Die große Effektivität der heterologen Immunisierung mit den rekombinanten Salmonellen gefolgt von ACT-CSP wird auch bei Betrachtung der Gesamtzahl der CSP-spezifischen T-Zellen in Milz und Leber deutlich, die durch Färbung mit dem H2-K^d / CSP₂₄₅₋₂₅₃-Pentamer ermittelt wurde (Abb. 4.24).

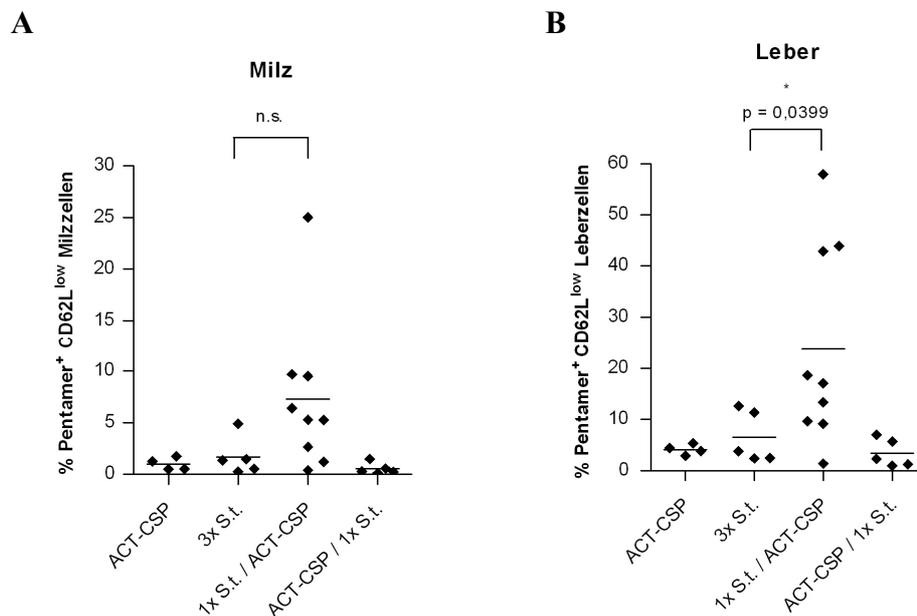


Abb. 4.24) Zahl der CSP-spezifischen T-Zellen nach Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) und ACT-CSP

Die Milz- und Leberzellen der in Abb. 4.23 beschriebenen immunisierten Mäuse wurden mit einem H2-K^d / CSP₂₄₅₋₂₅₃ –Pentamer sowie anti-CD8 und anti-CD62L gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Dargestellt ist die Zahl der CSP-spezifischen CD8⁺ Effektor-T-Zellen in Milz (A) und Leber (B). Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Die Querbalken geben die Mittelwerte an. Die Signifikanz wurde mit dem Student’s t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. Gezeigt ist eines von zwei Experimenten.

Jedoch wird in Abb. 4.24 auch deutlich, dass die heterologe *prime/boost*-Immunisierung im Vergleich mit einer Immunisierung mit den rekombinanten Salmonellen alleine nicht in allen Mäusen zu einer größeren Anzahl an spezifischen T-Zellen führt. Dies liegt möglicherweise daran, dass die einmalige Verabreichung der Salmonellen aufgrund der eingeschränkten Virulenz der Bakterien bei einigen Mäusen nur eine sehr schwache T-Zellantwort induziert. Diese kann dann durch die Immunisierung mit ACT-CSP nicht wesentlich gesteigert werden. Um zu untersuchen, ob sich dieses Problem durch dreimalige Gabe der Bakterien umgehen lässt, wurden Mäuse vor der Zweitimmunisierung mit ACT-CSP einmal oder dreimal mit dem Salmonellen-Stamm SB824 (pST-TB) immunisiert. In Abb. 4.25-A ist das Ergebnis des IFN γ -ELISPOT und in Abb. 4.25-B und -C die durchflusszytometrische Analyse der CSP-spezifischen T-Zellen dargestellt.

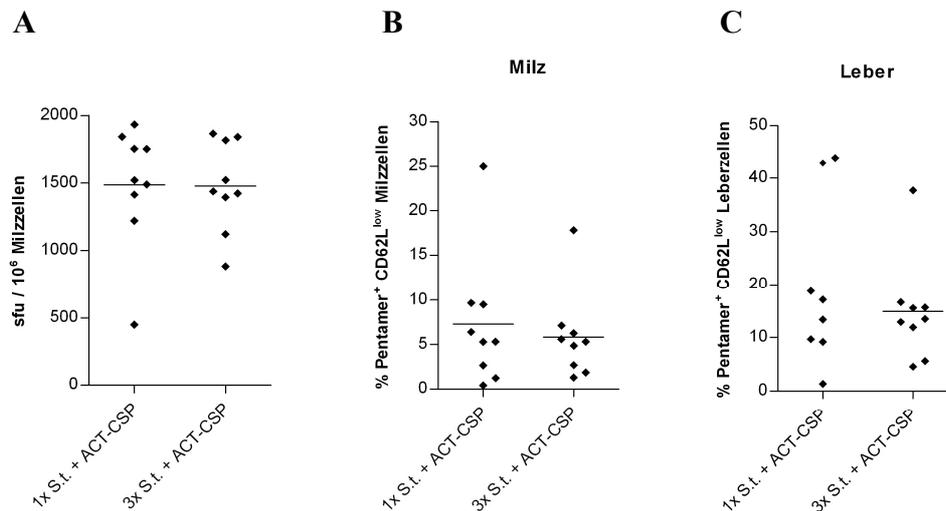


Abb. 4.25) Heterologe *prime/boost*-Immunisierung mit ein- oder dreimaliger Gabe von *S.t. SB824 (pST-TB)*

BALB/c-Mäuse erhielten als Primärimmunisierung ein- oder dreimal je 5×10^8 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) oral. Nach fünf Wochen erhielten die Mäuse je 20 μ g ACT-CSP intraperitoneal. Sieben Tage nach der Zweitimmunisierung wurden Milz- und Leberzellen präpariert. **A)** Die Zahl der IFN γ -produzierenden CSP-spezifischen T-Zellen in der Milz wurde mittels IFN γ -ELISPOT bestimmt. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus, die Querbalken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe an.

Die Milz- und Leberzellen der Mäuse wurden zudem mit einem H2-K^d/CSP₂₄₅₋₂₅₃-Pentamer sowie anti-CD8 und anti-CD62L gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Dargestellt ist die Zahl der CSP-spezifischen CD8⁺ Effektor-T-Zellen in Milz **(B)** und Leber **(C)**. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Die Querbalken geben die Mittelwerte an. Gezeigt ist eine Zusammenfassung aus drei Experimenten.

In dieser Zusammenfassung dreier Experimente zeigt sich, dass die Stärke der induzierten CSP-spezifischen T-Zellantwort nach einmaliger oder dreimaliger Gabe der Salmonellen im Mittel gleich ist. Auch die individuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Mäusen sind in beiden Gruppen vergleichbar.

4.3.2 Protektion nach heterologer *prime/boost*-Immunsisierung

Schließlich sollte untersucht werden, ob die starke CSP-spezifische T-Zellantwort nach der heterologen *prime/boost*-Immunsisierung auch mit einem signifikanten Schutz gegen eine *P. berghei*-Infektion korreliert. Dafür wurden BALB/c-Mäuse entsprechend dem Schema in Abb. 4.22-B mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) und anschließend mit ACT-CSP immunisiert. Sieben Tage nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse intravenös mit je 1000 *P. berghei* Sporozysten infiziert. Die Parasitämie wurde anhand von Blutaussstrichen verfolgt. Mäuse, die 14 Tage nach Infektion keine Parasiten im Blut aufwiesen, wurden als geschützt angesehen. Die Ergebnisse aus drei Experimenten sind in Tab. 4.3 zusammengefasst.

Tab. 4.3) *P. berghei*-Infektion nach heterologer *prime/boost*-Immunsisierung

BALB/c-Mäuse erhielten als Primärimmunisierung ein- oder dreimal je 5×10^8 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) oral. Nach fünf Wochen erhielten die Mäuse je 20 µg ACT-CSP intraperitoneal. Eine Kontrollgruppe erhielt lediglich PBS i.p. Sieben Tage nach der Zweitimmunisierung wurden die Mäuse mit je 1000 *P. berghei* Sporozysten intravenös infiziert. Der Verlauf der Parasitämien wurde anhand von Wright's stain-gefärbten Blutaussstrichen verfolgt. Mäuse, die an Tag 14 noch keine Parasiten im Blut aufwiesen, wurden als geschützt angesehen. Dargestellt ist eine Zusammenfassung von drei Experimenten.

Immunsisierung		Zahl der infizierten Tiere / Gesamtzahl	% Schutz
prime	boost		
-	PBS	15/15	0
1x <i>S. t.</i> SB824 (pST-TB)	ACT-CSP	5/9	44
3x <i>S. t.</i> SB824 (pST-TB)	ACT-CSP	0/12	100

Tatsächlich erzeugt die heterologe *prime/boost*-Immunsisierung mit Salmonellen gefolgt von einer Vakzinierung mit ACT-CSP eine sterile Immunität in allen Mäusen, die dreimal Salmonellen erhalten haben. Ob dies allein an der Zahl der CSP-spezifischen Effektor-T-Zellen liegt, oder ob durch die verschiedenen Antigen-träger auch T-Zellen mit

unterschiedlichen Effektorfunktionen induziert werden, kann hier noch nicht beantwortet werden. Möglicherweise spielen neben $\text{IFN}\gamma$ auch andere Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ oder die zytotoxische Aktivität eine Rolle. Wenn den Mäusen nur einmal Salmonellen als Primärimmunisierung verabreicht wurden, waren jedoch nur 44% der Mäuse gegen eine Infektion geschützt. Allerdings setzte die Parasitämie im Blut zum Teil erst sehr spät ein. Dies wird in Abb. 4.26 deutlich, in der die Parasitämien der Mäuse nach heterologer *prime/boost*-Immunsierung und anschließender Infektion mit *P. berghei*-Sporozoiten dargestellt sind.

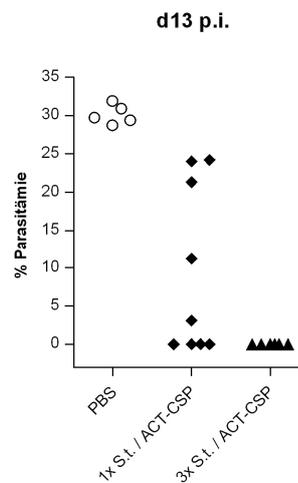


Abb. 4.26) Parasitämien immunisierter Mäuse nach Infektion mit *P. berghei*

BALB/c-Mäuse erhielten als Primärimmunisierung einmal oder dreimal je 5×10^8 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) oral. Nach fünf Wochen erhielten die Mäuse je 20 μg ACT-CSP intraperitoneal. Eine Kontrollgruppe erhielt lediglich PBS i.p. Sieben Tage nach der Zweitimmunisierung wurden die Mäuse mit je 1000 *P. berghei* Sporozoiten intravenös infiziert. Der Verlauf der Parasitämien wurde anhand von Wright's stain-gefärbten Blutaussstrichen verfolgt. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Dargestellt ist eine Zusammenfassung aus zwei Experimenten.

In den vorangegangenen Experimenten konnte kein signifikanter Unterschied in der Zahl der CSP-spezifischen T-Zellen und der Zahl der $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten nach einmaliger oder dreimaliger Immunisierung mit SB824 (pST-TB) und anschließender Zweitimmunisierung mit ACT-CSP festgestellt werden. Dennoch ergibt sich ein deutlicher Unterschied in der Rate der Protektion. Ob es sich dabei um interexperimentelle Varianzen handelt, oder ob beide heterologen *prime/boost*-Immunsierungen zu unterschiedlichen Immunantworten führen, bleibt in weiteren Experimenten zu untersuchen.

5 Diskussion

Die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen ist essentiell für die Immunabwehr gegen Viren, Tumore, intrazelluläre Bakterien und Parasiten. Um diese Zellen zu stimulieren, müssen Antigene in das zytosolische Kompartiment von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) gelangen bzw. transportiert werden. Verschiedene Antigenträger sind für die Induktion von CD8⁺ T-Zellen gut geeignet, z.B. virale und bakterielle Vektoren sowie DNA.

In dieser Arbeit wurde die Effektivität zweier verschiedener Antigenträgersysteme untersucht, die eine CD8⁺ T-Zellantwort gegen das Circumsporozoiten-Protein (CSP) von *Plasmodium berghei* induzieren sollten. CSP ist das am besten charakterisierte Antigen des Leber-Stadiums der Malaria. Es wurde bereits vor längerer Zeit gezeigt, dass CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellen gegen eine Malaria-Infektion schützen können (Schofield et al., 1987; Romero et al., 1989). Diese T-Zellen wurden durch Immunisierung mit bestrahlten Sporozoiten erzeugt und wirkten hauptsächlich über die Freisetzung von Interferon- γ (IFN γ) und die Induktion von Stickstoffmonoxid (NO) protektiv (Schofield et al., 1987, Doolan et al., 1996). In verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Antigenträgern wurde gezeigt, dass sich eine protektive CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort auch mit rekombinanten trägerbasierten Vakzinen induzieren lässt, jedoch war der Schutz meist nur partiell und nicht lange anhaltend (Sedegah et al., 1994; Lanar et al., 1996; Rodriguez et al., 1997; Tsuji et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen rekombinante Salmonellen als lebende Antigenträger und zum anderen die Adenylatcyclase von *B. pertussis* als nicht-replizierender Vektor verwendet.

5.1 *S. typhimurium* als Antigenträger

Salmonellen nutzen wie viele andere gram-negative Bakterien einen so genannten Typ III-Sekretionsapparat, um bakterielle Effektorproteine in das Zytosol eukaryotischer Zellen zu translozieren. Auf diesem Wege modulieren sie Zytoskelett und Signaltransduktionswege der Wirtszellen, um ihr Überleben im Wirt zu begünstigen. Dieses System kann für die Translokation heterologer Antigene genutzt werden, indem man diese als Fusionsmolekül mit einem Typ III-Effektorprotein in Salmonellen exprimiert. Anhand verschiedener Modellantigene wurde bereits gezeigt, dass sich auf diesem Wege protektive CTL-Antworten induzieren lassen (Rüssmann et al., 1998; Shams et al., 2002). Das am besten

charakterisierte Typ III-Effektorprotein ist YopE aus *Yersinia enterocolitica*, das aufgrund der großen Homologie der Systeme auch durch den Typ III-Sekretionsapparat von Salmonellen transloziert wird (Rosquist et al., 1995). Für YopE wurde der Teil des Proteins, der für die Translokation essentiell ist, genau untersucht. Die N-terminalen 50 Aminosäuren bilden die minimale Translokationsdomäne (Sory et al., 1995). Die erfolgreiche Induktion von CTL-Antworten durch rekombinante Salmonellen, die ein fremdes Antigen als Fusionsmolekül mit YopE exprimierten, wurde ebenfalls beschrieben (Rüssmann et al., 2001; Igwe et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, Salmonellen des Stammes *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) herzustellen, die ein Fusionsmolekül aus der Translokationsdomäne von YopE und dem CD8-Epitop CSP₂₄₅₋₂₅₃ (SYIPSAEKI) exprimieren. Der verwendete Salmonellen-Stamm SB824 (Rüssmann et al., 1998) ist *aroA*-defizient. Aufgrund dieser Mutation sind die Bakterien auxotroph für p-Aminobenzoat und 2,3-Dihydroxybenzoat. Diese Verbindungen kommen im Gewebe von Säugern nicht vor (Hoiseh et al., 1981). Aus diesem Grund können *aroA*-defiziente Salmonellen nur kurze Zeit im Gewebe von Säugern persistieren.

Die Expression des rekombinanten YopE-CSP-Fusionsmoleküls konnte mittels Immunfluoreszenz und Western Blot sowohl in Bakterienlysaten als auch im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Nachdem auf diese Weise gezeigt wurde, dass das Fusionsmolekül durch die rekombinanten Salmonellen in den Kulturüberstand sezerniert wird, konnte in einem Antigenpräsentationstest demonstriert werden, dass das CSP-Epitop SYIPSAEKI in das Zytosol eukaryotischer APZ transloziert und korrekt prozessiert sowie auf MHC I-Molekülen präsentiert wird.

5.1.1 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) induziert eine systemische CSP-spezifische Immunantwort

Mit dem Stamm *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) stand nun eine experimentelle Vakzine zur Verfügung, deren Immunogenität *in vivo* im Mausmodell untersucht werden konnte. Die orale Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) induzierte CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellen, die in Milz, Leber und Blut der immunisierten Mäuse nachgewiesen werden konnten. Dafür wurden zum einen MHC-Pentamere benutzt, die mit dem CSP-Peptid SYIPSAEKI beladen waren und selektiv an T-Zellen binden, deren TCR spezifisch für das CSP-Epitop ist. Zum anderen wurden CSP-spezifische IFN γ -produzierende T-

Zellen mittels ELISPOT detektiert. In allen untersuchten Organen fanden sich T-Zellen, die CSP-spezifisch $\text{IFN}\gamma$ produzierten. Dabei ist vor allem das Vorhandensein der Effektor-T-Zellen in der Leber von Bedeutung, da dieses Organ das Ziel der Sporozoiten-Infektion ist. Aufgrund der Kürze der Leberphase, die lediglich zwei bis drei Tage in der Maus dauert, ist eine schnelle Immunreaktion in der Leber essentiell für den Erfolg einer Immunisierung gegen das Leberstadium der Malaria-Infektion. Ob die CSP-spezifischen T-Zellen in der Leber aktiviert wurden oder erst nach ihrer Aktivierung in die Leber einwanderten, ist unklar. Johansson et al. haben jedoch gezeigt, dass DCs der Leber im Rahmen einer Salmonellen-Infektion Salmonellen internalisieren und Salmonellen-Antigene präsentieren können (Johansson et al., 2004).

Nach der Immunisierung mit SB824 (pST-TB) konnten keine CSP-spezifischen IL-4- oder IL-10-sezernierenden T-Zellen nachgewiesen werden. Die Zytokine IL-4 und IL-10 werden von $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen produziert, während $\text{IFN}\gamma$ hauptsächlich von $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen sezerniert wird. Es kann also deshalb davon ausgegangen werden, dass die Immunisierung mit *S. typhimurium* eine überwiegend $\text{T}_{\text{H}1}$ -basierte Immunantwort induziert. Für verschiedene Salmonellen-Stämme wurde bereits gezeigt, dass sie die Immunantwort stark in Richtung $\text{T}_{\text{H}1}$ polarisieren, indem sie die Freisetzung von $\text{IFN}\gamma$, IL-12, $\text{TNF-}\alpha$ und GM-CSF stimulieren (Mittrücker und Kaufmann, 2000; Capozzo et al., 2004; Johanson et al., 2004).

5.1.2 Problem der Persistenz und Plasmidstabilität bei *Salmonella*

Das Gleichgewicht zwischen Attenuierung und Infektiösität ist für den Erfolg eines lebenden bakteriellen Antigenträgers ebenso wichtig wie die Stabilität des rekombinanten Phänotyps. Nach einmaliger Applikation des Salmonellen-Stamms SB824 (pST-TB) wurde untersucht, ob und wie lange die Bakterien in Milz, Leber und Ausscheidungen der Mäuse nachweisbar waren, und ob bzw. wann sie das YopE-CSP-codierende Plasmid pST-TB verloren. Dabei stellte sich heraus, dass die Infektion sehr unterschiedlich verlief. In den Ausscheidungen der Mäuse konnten Salmonellen zwischen 3 und 21 Tage nach oraler Applikation der Bakterien nachgewiesen werden. Jedoch nur in wenigen Fällen blieb der rekombinante Phänotyp ebenso lange erhalten. Häufig hatten die Salmonellen schon drei Tage nach Infektion das Plasmid pST-TB verloren. In ihrer Fähigkeit, in Milz und Leber zu persistieren, waren die Salmonellen aufgrund ihrer *aroA*-Mutation erwartungsgemäß eingeschränkt und konnten bereits fünf Tage nach Infektion in Leber und Milz nicht mehr nachgewiesen werden.

Der stark unterschiedliche Verlauf der Salmonellen-Infektion spiegelte sich auch in der Stärke der induzierten CSP-spezifischen Immunantwort wieder. So zeigten die Mäuse, in denen die Salmonellen am längsten persistierten, die beste Immunantwort. Andere Mäuse entwickelten nur sehr schwache CSP-spezifische T-Zellantworten. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Mäuse dreimal im Abstand von drei Tagen mit den rekombinanten Salmonellen immunisiert, um eine verlängerte Präsenz des Antigens zu erreichen. Dies führte tatsächlich zu einer signifikant stärkeren T-Zellantwort. Die Zahl der IFN γ -produzierenden CSP-spezifischen T-Zellen in Milz und Leber verdoppelte sich. Jedoch blieb das Problem der großen individuellen Unterschiede bestehen.

Die individuell variierende Immunreaktion gegen den Trägerstamm stellt einen limitierenden Faktor für die Effizienz lebender bakterieller Antigenträger dar. Hinzu kommt noch das Problem einer eventuell bereits bestehenden Immunität gegen die Bakterien. So wurde gezeigt, dass eine vorangegangene Immunisierung bzw. Infektion mit Salmonellen die Fähigkeit der Bakterien, nach einer zweiten Immunisierung den Verdauungstrakt und die Milz zu besiedeln, stark beeinträchtigt. Deshalb führt auch eine Zweitimmunisierung mit Salmonellen einige Wochen nach der Primärimmunisierung nicht zu einer Verstärkung der primären T-Zellantwort gegen das heterologe Antigen (Domenech et al., 2005).

5.2 *B. pertussis* Adenylatcyclase als Antigenträger

Die Adenylatcyclase (ACT) aus *B. pertussis* ist ein bakterielles Toxin, das im Verlauf einer Infektion sezerniert wird und an die Membran eukaryotischer Zellen bindet. Daraufhin wird ihre katalytische Domäne in das Zytosol der Wirtszelle transloziert (Confer et al., 1982). Es wurde gezeigt, dass ACT spezifisch an das Integrin CD11b/CD18 bindet, das unter anderem auf DCs exprimiert wird (Ladant et al., 1999). Aufgrund dieser Fähigkeit kann ACT als Trägermolekül für heterologe Antigene genutzt werden, indem antigene Peptide an bestimmten Positionen der katalytischen Domäne eingefügt werden (Osička et al., 2000). Rekombinante ACT-Moleküle können dabei sowohl CTL-Antworten durch Translokation des Antigens ins Zytosol von APZ als auch CD4⁺ T-Zellantworten über klassische Endozytose des Fusionsmoleküls induzieren (Schlecht et al., 2004).

Innerhalb der katalytischen Domäne des in dieser Arbeit verwendeten Fusionsmoleküls ACT-CSP wurden zwei CD8-Epitope eingefügt: das CSP₂₄₅₋₂₅₃-Epitop SYIPSAEKI und

das Ovalbumin-Epitop OVA₂₅₇₋₂₆₄. Dabei diente das OVA-Epitop dem Nachweis der biologischen Aktivität des Moleküls *in vitro*. Zusätzlich wurde durch eine Aminosäureinsertion innerhalb des ATP-bindenden Bereichs des Toxins dessen katalytische Aktivität inhibiert.

In vitro konnte anhand der Aktivierung von OT-1 Milzzellen gezeigt werden, dass ACT-CSP biologisch aktiv ist und seine katalytische Domäne in das Zytosol eukaryotischer APZ transloziert. OT-1 T-Zellen tragen einen transgenen TCR, der spezifisch das Ovalbumin-Epitop OVA₂₅₇₋₂₆₄ erkennt. Die Inkubation von ACT-CSP mit OT-1 Milzzellen führte zur Proliferation der T-Zellen und der Freisetzung von IFN γ . Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die eingefügten CD8-Epitope in das MHC I-Kompartiment gelangen und korrekt prozessiert werden.

5.2.1 ACT-CSP induziert eine systemische CSP-spezifische Immunantwort

Mit dem Konstrukt ACT-CSP wurden sowohl C57Bl/6- als auch BALB/c-Mäuse immunisiert. C57Bl/6-Mäuse tragen MHC I-Moleküle vom Haplotyp H2-K^b, die das Epitop OVA₂₅₇₋₂₆₄ präsentieren können, wohingegen BALB/c-Mäuse MHC I-Moleküle vom Haplotyp H2-K^d exprimieren, die das Epitop CSP₂₄₅₋₂₅₃ präsentieren können. Die Verwendung dieser Mausstämmen ermöglicht daher den Nachweis von OVA- und CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten.

Tatsächlich konnten mit dem Fusionsmolekül ACT-CSP sowohl Ovalbumin- als auch CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellen *in vivo* induziert werden. Dies demonstriert die Eignung von ACT als multivalentes Trägermolekül, das sowohl verschiedene CD8-Epitope als auch CD4- und CD8-Epitope zusammen transportieren kann (Fayolle et al., 2001; Schlecht et al., 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bereits die einmalige Immunisierung mit ACT-CSP eine systemische Immunantwort induziert. CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellen ließen sich in Milz, Leber und Blut der immunisierten Mäuse mittels Pentamer-Färbung nachweisen. Dabei waren CSP-spezifische IFN γ -sezernierende Effektor-T-Zellen sowohl in der Milz als auch in der Leber detektierbar, während keine CSP-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden konnten, die IL-4 oder IL-10 freisetzen. Die Immunisierung mit ACT-CSP induzierte also ebenfalls eine T_H1-basierte Immunantwort. Dies wurde auch für andere rekombinante ACT-Fusionsmoleküle beschrieben (Dadaglio et al., 2000; Schlecht et al., 2004). Möglicherweise beruht die adjuvante Wirkung des ACT auf der Bindung an CD11b/CD18 auf DCs und anderen

Zellen des angeborenen Immunsystems oder auch auf dem Vorgang der Translokation selbst.

In einem weiteren Schritt wurde versucht, die primäre Immunantwort, die durch Immunisierung mit ACT-CSP induziert wurde, durch eine Zweit- oder Drittimmunisierung mit ACT-CSP zu verstärken. Dabei konnte jedoch weder eine erhöhte Frequenz der gesamten CSP-spezifischen T-Zellen noch eine gesteigerte Anzahl IFN γ -produzierender Effektorzellen nachgewiesen werden. Die mehrfache Applikationen von ACT-CSP führte also zu keiner Steigerung der primären CSP-spezifischen T-Zellantwort. In der Literatur finden sich zwar Beispiele, bei denen eine Zweitimmunisierung mit ACT zu einer verbesserten T-Zellantwort führte (Fayolle et al., 1996), jedoch wurde hier allein die Zahl der induzierten CTL analysiert und nicht die Gesamtzahl antigenspezifischer T-Zellen und IFN γ -produzierender Effektor-T-Zellen. Möglicherweise führt also die mehrfache Applikation des ACT-Konstrukts zu einem höheren Anteil an zytotoxischen T-Zellen. Im hier untersuchten Modell wurde die Zahl der CTL jedoch nicht bestimmt, da deren Aktivität nicht entscheidend für die protektive Immunität gegen das Leberstadium der Malaria ist (Schofield et al., 1987, Doolan et al., 1996). Andere Studien zeigen zudem ein ähnliches Fehlschlagen einer homologen *prime/boost*-Immunisierung (Anderson et al., 2002).

Verschiedene Faktoren könnten dazu beitragen, dass die Zweitimmunisierung mit ACT-CSP keinen Effekt auf die primäre T-Zellantwort hat. Denkbar ist zum einen eine Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) in Folge der Primärimmunisierung. Diese könnten dann nach der Zweitimmunisierung der weiteren Aktivierung und Expansion antigenspezifischer T-Zellen entgegenwirken. So wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass eine Depletion von $CD4^+ CD25^+ T_{Reg}$ vor einer Immunisierung eine deutlich gesteigerte T-Zellantwort gegen virale oder Tumorantigene zur Folge hat (Kursar et al., 2004; Toka et al., 2004; Prasad et al., 2005). T_{Reg} sind wichtige Regulatoren des Immunsystems. Sie dienen der Erhaltung der peripheren Toleranz gegen Selbstantigene und der Begrenzung einer T-Zellaktivierung im Rahmen einer Infektion (Übersicht bei Sakaguchi, 2005). Das Fehlen von T_{Reg} führt zu Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen (Asano et al., 1996; Shevach, 2000). Um eine Beteiligung von T_{Reg} im Rahmen der Immunisierung mit ACT-CSP zu untersuchen, wurde die Zahl der $Foxp3^+ CD4^+$ T-Zellen vor und nach der Immunisierung durchflußzytometrisch bestimmt. Foxp3 ist ein Transkriptionsfaktor, der spezifisch in T_{Reg} aktiv ist und eine zentrale Rolle

bei der Ausbildung ihres regulatorischen Phänotyps spielt (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Im Gegensatz dazu ist der häufig verwendete Marker CD25 (IL-2R α) nicht nur auf T_{Reg}, sondern auch auf aktivierten Effektor-T-Zellen exprimiert und deshalb nur bedingt zur Unterscheidung dieser Zellpopulationen geeignet. Die Zahl der Foxp3⁺ T_{Reg} in Milz und Leber veränderte sich weder in Folge der Primär- noch der Zweitimmunisierung. Dies schließt zwar nicht aus, dass ruhende T_{Reg} im Rahmen der Immunisierung aktiviert wurden, ohne dass ihre Zahl sich änderte. Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, da Fayolle et al. zeigen konnten, dass eine Primärimmunisierung mit dem ACT-Vektor ohne fremdes Antigen eine nachfolgende Immunisierung mit einem ACT-Fusionsmolekül nicht negativ beeinflusst (Fayolle et al., 2001). Das bedeutet, dass eine ACT-spezifische Immunreaktion in Folge einer Immunisierung oder einer *B. pertussis*-Infektion sich nicht limitierend auf eine spätere Immunisierung mit ACT auswirkt, und widerspricht der Theorie, dass induzierte T_{Reg} die Expansion der Effektor-T-Zellen nach einer Zweitimmunisierung verhindern. Eine andere mögliche Ursache für das Fehlschlagen der homologen *prime/boost*-Immunisierung wäre ein selbst-limitierender Mechanismus der aktivierten T-Zellen selbst. So wäre es denkbar, dass Memory-T-Zellen sensitiver auf negativ-regulatorische Mechanismen reagieren als naive T-Zellen.

5.3 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) und ACT-CSP erzeugen CSP-spezifische Memory-T-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass beide im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Antigen-träger in der Lage waren, eine Memory-T-Zellantwort zu generieren. Drei Monate nach Immunisierung mit ACT-CSP hatte sich die Zahl der IFN γ -produzierenden T-Zellen in der Milz etwa halbiert, während die Gesamtzahl der CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber nur wenig abnahm. Ein ähnliches Bild bot sich nach Immunisierung mit dem Salmonellen-Stamm SB824 (pST-TB). So fanden sich drei Monate nach Immunisierung CSP-spezifische CD8⁺ Memory-T-Zellen in Milz, Leber und Blut der immunisierten Mäuse. Der Phänotyp der Zellen bzw. deren anatomische Verteilung war nach beiden Immunisierungen ähnlich. In der Milz fanden sich zu etwa 70% zentrale (T_{CM}) und 30% Effektor-Memory-T-Zellen (T_{EM}), die anhand ihrer CD62L-Expression unterschieden wurden. In der Leber war das prozentuale Verhältnis umgekehrt. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Literatur, wonach T_{CM} überwiegend in lymphatischen und T_{EM} in nicht-lymphatischen Organen zu finden sind (Lanzavecchia et

al., 2004). Nach dem Modell von Lanzavecchia et al. dienen T_{CM} vorwiegend als Reservoir für T_{EM} , indem sie homöostatisch proliferieren und nach Antigenkontakt schnell expandieren sowie IL-2 freisetzen. T_{EM} sind hingegen durch schnelle Effektorfunktionen nach Antigenkontakt, wie Zytokinfreisetzung und zytotoxische Aktivität, gekennzeichnet. Welche Memory-Zellpopulation am wichtigsten für einen Schutz gegen eine Infektion ist, hängt vom Erreger ab. Für die Leberphase der Malaria wurde beschrieben, dass die Persistenz von T_{EM} in der Leber, die innerhalb von wenigen Stunden nach Antigenkontakt große Mengen IFN γ freisetzen können, essentiell für eine anhaltende protektive Immunität ist (Krzych et al., 2000; Berenzon et al., 2003). Dies wurde anhand der Immunisierung von Mäusen mit bestrahlten Sporoziten untersucht, die eine langanhaltende Protektion gegen die Leberphase der Malaria induzieren. Dabei wurde postuliert, dass die homöostatische Proliferation der T_{CM} in der Leber abhängig ist von der Verfügbarkeit von IL-15, da sie den IL-15R (CD122) verstärkt exprimieren. Im Gegensatz dazu schien die Persistenz der T_{EM} in der Leber abhängig von der Anwesenheit von Leberphasen-Antigenen zu sein, die vermutlich die Differenzierung von T_{CM} in T_{EM} induzierten. In Abwesenheit von Antigenen nahm die Zahl der T_{EM} in der Leber kontinuierlich ab. Dies war mit einem Verlust der Protektion verbunden.

Wie bereits gezeigt wurde, waren die Salmonellen aufgrund ihrer Attenuierung nur sehr kurze Zeit in der Leber präsent. Dies gilt vermutlich auch für die Adenylatcyclase als nicht-replizierenden Vektor. Vor diesem Hintergrund erscheinen beide Antigenträger deshalb nicht optimal für die Induktion einer lange persistierenden Effektor-Memory-Population in der Leber, auch wenn drei Monate nach Immunisierung eine große Zahl T_{EM} in der Leber der Mäuse nachgewiesen werden konnte. Um die Frage der Persistenz der Memory-Zellen zu klären, bedürfte es weiterer Langzeit-Experimente.

5.4 SB824 (pST-TB) und ACT-CSP erzeugen keine Protektion

Sowohl die dreimalige Applikation von *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) als auch die homologe *prime/boost*-Immunisierung mit ACT-CSP konnten keine protektive Immunität erzeugen. Nach Immunisierung mit ACT-CSP und Infektion mit *P. berghei* Sporoziten erkrankten alle Mäuse und zeigten einen normalen Anstieg der Parasitämie. Dies zeigt, dass die in der Leber vorhandenen CSP-spezifischen Effektor-T-Zellen nicht ausreichten, um die Freisetzung von Merozoiten ins Blut zu verhindern. Da eine einzelne infizierte Leberzelle bis zu 30000 Merozoiten freisetzt, genügen vermutlich wenige infizierte

Leberzellen, die der CSP-spezifischen Immunantwort entgehen, um eine Blutphase zu etablieren. Die Immunisierung mit ACT-CSP scheint keine weiteren unspezifischen Immuneffektormechanismen zu aktivieren, die der Replikation der Parasiten der Blutphase entgegen wirken könnten.

Nach Immunisierung mit den rekombinanten Salmonellen waren nur etwa 20% der Mäuse geschützt. Die restlichen Mäuse entwickelten eine verlangsamte Blutphase. Dieser Effekt des verzögerten Anstiegs der Parasitämie war jedoch auch bei den Mäusen zu beobachten, die mit einem Kontrollstamm immunisiert worden waren. Vermutlich ist er auf die Aktivierung der angeborenen Immunabwehr zurückzuführen. Salmonellen wirken bei einer Immunisierung als natürliches Adjuvanz, d.h. sie können Zellen des unspezifischen Immunsystems wie Makrophagen und DCs aktivieren. Diese verfügen über ein Repertoire an konservierten Rezeptoren, mit deren Hilfe sie universelle Pathogen-assoziierte Strukturen (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*) erkennen können (Übersicht bei Janeway und Medzhitov, 2002). Diese Rezeptoren werden als *pattern recognition receptors* (PRR) bezeichnet. Die Aktivierung von PRRs führt zum Beispiel zur Phagozytose von Pathogenen und Sezernierung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- α . Zudem kommt es in Folge dieser Aktivierung zur verstärkten Expression der costimulatorischen Moleküle CD80/86 und Präsentation von Antigenen auf MHC-Molekülen, so dass aktivierte Makrophagen und DCs die spezifische Immunabwehr einleiten können. Zu den von Salmonellen exprimierten PAMPs gehören z.B. LPS, Flagellin und CpG-DNA, die über spezifische Rezeptoren, die *toll-like receptors* (TLR), DCs aktivieren und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine induzieren (Royle et al., 2003; Bachmann et al., 2006).

Die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems wie DC, Makrophagen, NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen im Verlauf der Malaria-Infektion ist wichtig für die Kontrolle der Replikation und die Eliminierung der Plasmodien sowie für die Einleitung der spezifischen Immunantwort (Übersicht bei Stevenson und Riley, 2004). Dabei spielen vor allem proinflammatorische Zytokine eine Rolle. So sind z.B. im Rahmen der natürlichen *P. falciparum*-Infektion $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen Quellen einer frühen IFN γ -Produktion, NK-Zellen sind zudem zytotoxisch für infizierte Erythrozyten (de Souza et al., 1997; Mohan et al., 1997).

Die durch die Salmonellen-Immunisierung aktivierte angeborene Immunabwehr kann also dazu beitragen, die Parasitämie der immunisierten Mäuse zu kontrollieren. In

Kombination mit der CSP-spezifischen T-Zellaktivität in der Leberphase ist dieser Effekt möglicherweise stärker ausgeprägt, so dass unklar bleibt, ob die beobachtete Protektion bei 20% der Mäuse ursächlich auf die CSP-spezifische oder die Kombination der spezifischen und der unspezifischen Immunabwehr zurückzuführen ist.

5.5 CTLA-4-Blockade

5.5.1 CTLA-4-Blockade während der Zweitimmunisierung mit ACT-CSP verstärkt die primäre CSP-spezifische Antwort

CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*, CD152) ist ein negativer Regulator der T-Zellaktivierung. Er ist auf aktivierten T-Zellen exprimiert und konkurriert mit CD28 um die Bindung an CD80/86, was zur Abschaltung der T-Zellen beiträgt (Walunas et al., 1994; Krummel et al., 1995). Zudem ist CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen konstitutiv exprimiert und spielt eine zentrale Rolle bei der Suppression der T-Zellaktivierung (Takahashi et al., 2000; Grohmann et al., 2002).

Wie bereits dargestellt führte die homologe *prime/boost*-Immunisierung mit ACT-CSP nicht zu einer Steigerung der primären CSP-spezifischen T-Zellantwort. Um zu untersuchen, ob das negativ-regulatorische Molekül CTLA-4 dabei eine Rolle spielt, wurde ein monoklonaler blockierender Antikörper gegen CTLA-4 in Kombination mit der primären oder der zweiten Immunisierung mit ACT-CSP appliziert. Während die Blockade der CTLA-4-Interaktionen während der primären Immunisierung keine Auswirkung auf die Zahl der aktivierten T-Zellen hatte, führte die Applikation von anti-CTLA-4 während der Zweitimmunisierung jedoch zu einer gesteigerten T-Zellantwort. Dabei fanden sich sowohl in der Milz als auch in der Leber signifikant mehr CSP-spezifische T-Zellen insgesamt und auch mehr IFN γ -produzierende Effektor-T-Zellen.

Bisher wurde vor allem der therapeutische Einsatz von blockierenden Antikörpern gegen CTLA-4 in der Tumorbilogie beschrieben. So wurde gezeigt, dass durch die CTLA-4-Blockade eine Toleranz gegen Tumorantigene überwunden werden kann (Hernandez et al., 2001; Jovasevic et al., 2004). Aber auch im Zusammenhang mit Immunisierungen kann eine CTLA-4-Blockade die induzierte T-Zellantwort steigern (Gregor et al., 2004; Met et al., 2006). Gregor et al. untersuchten anhand von DNA-Immunisierungen gegen verschiedene Tumorantigene die Wirkung einer CTLA-4-Blockade. Interessanterweise zeigte sich dabei, dass die Blockade von CTLA-4 vor allem bei der Zweitimmunisierung wirksam ist, ähnlich wie im hier untersuchten System. Es gibt verschiedene

Möglichkeiten, wie sich die Blockade der CTLA-4-Interaktionen auswirken kann. Eine Möglichkeit ist die Inhibition der Effektorfunktionen regulatorischer T-Zellen. Wie bereits diskutiert, ist es denkbar, dass in Folge der Immunisierung regulatorische T-Zellen aktiv werden, die über CTLA-4 aktivierte Effektor-T-Zellen abschalten. Eine weitere Möglichkeit ist eine direkte Wirkung der CTLA-4-Blockade auf die Effektor-T-Zellen selbst. Dabei könnte die Stärke der CTLA-4-Expression entscheidend für die Auswirkung der CTLA-4-Blockade sein. So wurde postuliert, dass Memory-T-Zellen sensitiver auf eine CTLA-4-Blockade reagieren als frisch aktivierte naive T-Zellen (Gregor et al., 2004).

Nicht nur die Zahl der Effektor-T-Zellen konnte durch die CTLA-4-Blockade gesteigert werden, auch die Zahl der Memory-T-Zellen in Milz und Leber war signifikant höher. Darüber hinaus fanden sich in allen Organen, anders als nach alleiniger Immunisierung mit ACT-CSP, mehr T_{EM} als T_{CM} . Auch in der Milz waren im Gegensatz zur Immunisierung ohne anti-CTLA-4 nach drei Monaten die T_{EM} die überwiegende Memory-T-Zellpopulation. Ob dieser Effekt lediglich auf eine verlängerte T-Zellaktivierung zurückzuführen ist, oder ob die Blockade von CTLA-4 während der Immunisierung T-Zellen eines anderen Phänotyps erzeugt, bleibt noch zu untersuchen.

5.5.2 In Kombination mit anti-CTLA-4 erzeugt ACT-CSP eine partielle protektive Immunität

Die Blockade von CTLA-4 während der Zweitimmunisierung mit ACT-CSP führte zu einer protektiven Immunität gegen eine Infektion mit *P. berghei* Sporoziten in fast 70% der immunisierten Mäuse, während die Gabe von anti-CTLA-4 alleine oder die einmalige Immunisierung mit ACT-CSP in Anwesenheit von anti-CTLA-4 keinen Einfluss auf den Verlauf der *P. berghei*-Infektion hatte. Dieser protektive Effekt ist also nicht auf eine unspezifische Wirkung des Antikörpers während der Infektion, sondern auf die gesteigerte CSP-spezifische T-Zellantwort zurückzuführen. Jedoch wurde keine langfristig wirksame protektive Immunität induziert. Trotz der signifikant höheren Zahl an Memory-T-Zellen und des prozentual größeren Anteils von T_{EM} in der Leber nach Immunisierung mit ACT-CSP in Kombination mit anti-CTLA-4 war bei einer Infektion drei Monate nach der Immunisierung nur noch eine von sechs Mäusen gegen die Infektion geschützt. Dies spricht dafür, dass die Zahl der vorhandenen Memory-T-Zellen, die nach Kontakt mit dem Antigen CSP sofort $IFN\gamma$ sezernieren, im Zeitraum von drei Monaten nach Immunisierung unter einen kritischen Schwellenwert gesunken ist.

5.6 Heterologe *prime/boost*-Immunisierungen

In der Literatur finden sich verschiedene Beispiele dafür, dass eine heterologe *prime/boost*-Immunsierung, also eine Immunsierung gegen ein Antigen mit Hilfe verschiedener Trägersysteme, wesentlich erfolgreicher ist, als eine homologe *prime/boost*-Immunsierung (Schneider et al., 1998; Gilbert et al., 2002). Deshalb wurde in dieser Arbeit auch die Kombination der beiden hier hergestellten Antigenträger untersucht.

5.6.1 Die Reihenfolge der Immunsierung ist kritisch

Für die heterologe *prime/boost*-Immunsierung gab es zwei Möglichkeiten: entweder eine primäre Immunsierung mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) und eine Zweitimmunsierung mit ACT-CSP oder eine primäre Immunsierung mit ACT-CSP, gefolgt von einer Immunsierung mit rekombinanten Salmonellen. Es zeigte sich, dass die Reihenfolge entscheidend für den Erfolg der Immunsierung ist. Die Immunsierung mit ACT-CSP gefolgt von einer Immunsierung mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) führte nicht zu einer Steigerung der primären CSP-spezifischen Antwort, während bei Immunsierung mit den rekombinanten Salmonellen gefolgt von ACT-CSP eine signifikant stärkere T-Zellantwort in Milz und Leber der Mäuse nachgewiesen wurde. Diese heterologe Immunsierung war darüber hinaus deutlich effektiver als die homologe *prime/boost*-Immunsierung mit ACT-CSP in Kombination mit anti-CTLA-4 und war deshalb die beste der hier untersuchten Vakzinierungsstrategien.

Der hier verwendete Salmonellen-Stamm ist wie bereits gezeigt aufgrund der *aroA*-Mutation sehr beeinträchtigt in seiner Fähigkeit, in Leber und Milz zu persistieren. Vermutlich trägt bei einer Zweitimmunsierung mit den rekombinanten Salmonellen die primäre CSP-spezifische T-Zellantwort zusätzlich dazu bei, mit Salmonellen infizierte Makrophagen schneller zu eliminieren. So wird wahrscheinlich der Verlust des YopE-CSP-codierenden Plasmids pST-TB begünstigt und eine längere Anwesenheit des Antigens verhindert. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass die Zweitimmunsierung mit den rekombinanten Salmonellen die primäre T-Zellantwort nicht steigern konnte.

Auch in anderen Studien wurde bereits beobachtet, dass die Reihenfolge einer heterologen *prime/boost*-Immunsierung kritisch sein kann. Gilbert et al. führten heterologe Immunsierungen gegen *P. berghei* CSP mit Hilfe eines adenoviralen Vektors und Plasmid-DNA durch, wobei nur der adenovirale Vektor die primäre CSP-spezifische T-

Zellantwort steigern konnte, nicht aber die DNA-Immunsierung (Gilbert et al., 2002). Ein ähnlicher Effekt wurde für die Kombination verschiedener viraler Vektoren beschrieben (Li et al., 1993; Plebanski et al., 1998). Welche Faktoren dabei eine Rolle für den Erfolg der heterologen *prime/boost*-Immunsierung spielen, ist noch nicht bekannt. Ebenso sind die Mechanismen, die dazu beitragen, dass eine heterologe *prime/boost*-Immunsierung sehr viel besser als eine homologe wirkt, noch nicht aufgeklärt. Möglich ist, dass die verschiedenen Antigen-träger zur Antigen-Präsentation auf unterschiedlichen Subpopulationen der APZ führen und deshalb die T-Zellen jeweils in anderer Weise aktivieren. Ebenso ist denkbar, dass die verschiedenen Träger jeweils selbst ein spezifisches Zytokinmilieu induzieren. So aktivieren die Salmonellen beispielsweise Zellen des angeborenen Immunsystems über TLRs, während die Adjuvanzwirkung des ACT vermutlich in der Bindung an CD11b/CD18 auf DCs begründet liegt. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung verschiedener TLRs auf DCs synergistisch die Expression bestimmter Zytokine induziert, und es wurde postuliert, dass die Kombination verschiedener TLR-Agonisten einen „Code“ zur Unterscheidung von Pathogenen darstellt (Napolitani et al., 2005). Dies könnte dazu beitragen, dass die induzierten T-Zellen nach einer heterologen *prime/boost*-Immunsierung stärker expandieren als nach wiederholter Begegnung mit dem gleichen Antigen im gleichen Kontext.

5.6.2 Die heterologe *prime/boost*-Immunsierung mit SB824 (pST-TB) und ACT-CSP erzeugt eine sterile Immunität

Die heterologe *prime/boost*-Immunsierung mit den rekombinanten Salmonellen gefolgt von ACT-CSP induzierte eine sterile Immunität in allen immunisierten Mäusen, die als Primärimmunisierung dreimal Salmonellen erhalten hatten. Das bedeutet, dass nach Infektion mit *P. berghei* Sporozoiten in den behandelten Mäusen zu keinem Zeitpunkt eine Parasitämie detektiert werden konnte. Es bleibt unklar, ob diese sterile Immunität allein durch die erhöhte Zahl an CSP-spezifischen IFN γ -sezernierenden T-Zellen in der Leber vermittelt wurde, oder ob auch andere Effektorfunktionen eine Rolle spielen. Ebenso bleibt noch zu untersuchen, ob die heterologe *prime/boost*-Immunsierung einen lang anhaltenden Schutz erzeugen kann.

Wurden die Mäuse hingegen nur einmal mit den rekombinanten Salmonellen und später mit ACT-CSP immunisiert, waren nur 44% der Mäuse vor einer *P. berghei*-Infektion geschützt. Dies ist erstaunlich, da die Stärke der induzierten Immunantwort bzw. die Zahl

der IFN γ -produzierenden Zellen nach einer heterologen *prime/boost*-Immunisierung gleich ausfiel, unabhängig von der Häufigkeit der Salmonellen-Applikation. Es bleibt zu untersuchen, ob die geringere Protektionsrate auf interexperimentelle Varianzen zurückzuführen ist, oder ob andere, noch nicht definierte Effektormechanismen zu diesem Unterschied beitragen.

Eine sterile Immunität gegen die Leberphase der Malaria wurde in verschiedenen Studien durch Immunisierung mit bestrahlten oder mutierten Sporozoiten erreicht (Nussenzweig et al., 1967; Müller et al., 2005). Beide Methoden beruhen auf dem Prinzip, dass die attenuierten Sporozoiten zwar Leberzellen infizieren können, sich aber nicht mehr zu Merozoiten entwickeln. Dadurch kommt es zu einer längeren Präsenz von Leberphasen-Antigenen in der Leber und zur Induktion protektiver und lang anhaltender CTL-Antworten. Die induzierte Immunantwort ist durch T_H1-Zytokine wie IFN γ gekennzeichnet (White et al., 1994). Andere Immunisierungsstrategien gegen Leberphasen-Antigene, die z.B. virale Vektoren nutzen, konnten zwar auch zum Teil eine protektive Immunität erzeugen, aber keinen anhaltenden Schutz. Die Mechanismen, die zu einer langfristig anhaltenden Memory-Antwort, speziell der Induktion von Effektor-Memory-T-Zellen, in der Leber führen, sind noch nicht geklärt. Es wurde postuliert, dass die Dauer des Antigenkontakts eine Rolle spielen könnte. Ebenso scheinen CD4⁺ T-Helfer-Zellen eine Rolle zu spielen. So ist zwar die primäre CD8⁺ T-Zellantwort unabhängig von CD4⁺ T-Zellen, jedoch scheint die CD4⁺ T-Zell-Hilfe wichtig für die Differenzierung von T_{EM} und T_{CM} zu sein (Carvalho et al., 2002; Wherry et al., 2003).

5.7 Ausblick

Die bisher einzig wirksame Immunisierung gegen das Leberstadium der Malaria, die eine lang anhaltende protektive Immunität erzeugt, ist die Immunisierung mit attenuierten Sporozoiten, die entweder durch Bestrahlung oder eine Mutation nicht mehr in der Lage sind, in die Blutphase der Malaria-Infektion einzutreten (Nussenzweig et al., 1967; Müller et al., 2005). Jedoch stellt dies aufgrund der anspruchsvollen und kostenintensiven Herstellung der Sporozoiten keine Alternative für einen massenhaften Einsatz als Vakzine dar. In diversen Studien wurde gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, durch die Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort gegen Leberphasen-Antigene mit Hilfe von trägerbasierten Impfstoffen Mäuse gegen eine Malaria-Infektion zu schützen. Jedoch stellen wie auch in der vorliegenden Arbeit die Zahl der induzierten Effektor-T-Zellen sowie die Persistenz

der Effektor-Memory-T-Zellen in der Leber gravierende Probleme dar. Zudem sind viele Plasmodien-Antigene hoch polymorph oder treten als antigene Varianten in Multigenfamilien auf. Multivalente Immunisierungen gegen verschiedene Leber- und Blutphasen-Antigene könnten dieses Problem umgehen. Dafür ist es auch nötig, weitere geeignete Antigene der Leber- und der Blutphase zu charakterisieren. So ist das Circumsporozitenprotein zwar gut charakterisiert, allerdings wird seine Expression im Verlauf der Infektion der Hepatozyten stark vermindert. Die Identifizierung neuer Antigene, die länger in der Leberphase präsent sind, könnte vermutlich die Induktion protektiver Immunantworten erleichtern.

Ein weiterer Aspekt ist die immunologische Besonderheit der Leber. Sie wird auch als „Friedhof aktivierter T-Zellen“ bezeichnet, da gezeigt wurde, dass aktivierte T-Zellen in die Leber migrieren und dort abgeschaltet bzw. durch Apoptose eliminiert werden (Crispe et al., 2000; Knolle und Limmer, 2001; Klugewitz et al., 2002). Dazu trägt das in der Leber vorherrschende suppressive Zytokinmilieu mit TGF- β und IL-10 bei. Zudem gilt die Leber als tolerogenes Organ. So können die endothelialen Zellen der Leber (LSEC, *liver sinusoidal endothelial cells*) oral aufgenommene Antigene präsentieren und eine antigenspezifische Toleranz erzeugen (Limmer et al., 2005). Diese Besonderheiten erschweren vermutlich die Induktion einer dauerhaften Immunität gegen das Leberstadium der Malaria.

Die Kombination verschiedener Antigenträger in heterologen Immunisierungen stellt wahrscheinlich die beste Strategie dar, um protektive Immunantworten gegen das Leberstadium der Malaria zu erzeugen. Durch die Weiterentwicklung der bisher bekannten sowie die Herstellung neuer Antigenträger, die z.B. eine bessere Persistenz in der Leber und eine längere Antigenpräsentation erreichen, ließe sich die immunogene Effizienz der heterologen Immunisierung womöglich noch steigern.

Ein anderer Ansatz zur Induktion einer Immunität gegen Malaria in Endemiegebieten wird mit der präventiven Behandlung von Kleinkindern verfolgt. Es ist bekannt, dass Menschen in Malaria-Endemiegebieten nur langsam durch wiederholte Infektionen eine klinische Immunität gegen Malaria entwickeln, welche vor allem durch eine humorale Immunantwort gekennzeichnet ist, während Leberphasen-spezifische CTLs kaum auftreten. Es gibt Studien, die die These unterstützen, dass die Blutphase der Malaria-Infektion die Suppression oder Eliminierung Leberphasen-spezifischer T-Zellen verursacht (Xu et al., 2002; Ocana-Morgner et al., 2003). In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse einer Studie über die präventive Malariabehandlung von Kleinkindern

interessant (Schellenberg et al., 2005). Kinder unter fünf Jahren sind am stärksten gefährdet, einer schweren Malaria-Infektion zu erliegen. Durch periodische prophylaktische Behandlung von Kleinkindern mit dem Medikament Sulfadoxin-Pyrimethamin im Abstand von wenigen Monaten konnte erreicht werden, dass sowohl während als auch nach Ende der Behandlung weniger Malaria-Infektionen als in der Kontrollgruppe auftraten. Dieses Medikament ist gegen Parasiten der Blutphase wirksam. Die periodische Suppression der Malaria-Blutphase scheint also die Ausbildung der Immunität der Kinder beschleunigt zu haben. Trotz dieses viel versprechenden Ergebnisses ist die massenhafte prophylaktische Behandlung von Kleinkindern auf lange Sicht problematisch, da sie die ohnehin zunehmende Ausbreitung von resistenten Plasmodien-Stämmen unterstützen würde. Die Entwicklung eines Impfstoffs, der eine dauerhafte Immunität gegen die Malaria-Infektion induziert oder zumindest den Verlauf der Infektion so stark abmildert, dass die hohe Sterblichkeit von Kleinkindern vermindert wird, bleibt also ein wichtiges Ziel der Malaria-Forschung.

6 Zusammenfassung

Die Immunisierung gegen das Leberstadium der Malaria ist mit vielen Schwierigkeiten verbunden, die in der immunologischen Besonderheit der Leber aber vor allem auch in der Komplexität des Parasiten und dessen Lebenszyklus begründet liegen. Ein Problem ist die hohe Anzahl an polymorphen Antigenen. Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Induktion einer zellulären Immunantwort, die essentieller Bestandteil einer protektiven Immunität gegen die intrazellulären Parasiten ist. Um eine solche CD8⁺ T-Zellantwort zu erzeugen, muss das entsprechende Antigen in das zytosolische Kompartiment von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) transportiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung zweier rekombinanter Antigenträger untersucht, eine protektive CD8⁺ T-Zellantwort gegen das Circumsporozoiten-Protein (CSP) der *Plasmodium berghei* Sporozoiten zu erzeugen. Durch Immunisierungen mit attenuierten Sporozoiten wurde bereits gezeigt, dass eine zelluläre Immunantwort gegen CSP einen Schutz gegen eine Malaria-Infektion vermitteln kann (Schofield et al., 1987; Romero et al., 1989).

Im Rahmen der Arbeit wurde zum einen der rekombinante Salmonellen-Stamm *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) hergestellt. Die Salmonellen dieses Stammes exprimieren ein Fusionsmolekül aus dem bakteriellen Effektorprotein YopE und dem CD8-Epitop des *P. berghei* CSP. Der YopE-Teil des Fusionsmoleküls vermittelt dessen Translokation in das Zytosol eukaryotischer Zellen über den Typ III-Sekretionsapparat der Salmonellen und ermöglicht so den Transport des CSP-Epitops in das MHC I-Kompartiment.

Des Weiteren wurde die bakterielle Adenylatcyclase (ACT) aus *B. pertussis* als nicht-replizierender Antigenträger verwendet. Aufgrund der Fähigkeit der Adenylatcyclase, an eukaryotische Zellen zu binden und ihre katalytische Domäne in deren Zytosol zu translozieren, kann sie als Transportermolekül für CD8-Epitope genutzt werden. Das hier verwendete rekombinante ACT-Molekül ACT-CSP enthält innerhalb seiner katalytischen Domäne das CD8-Epitop des *P. berghei* CSP.

Es konnte hier gezeigt werden, dass sowohl die Translokation des YopE-CSP-Fusionsmoleküls durch die rekombinanten Salmonellen als auch die Translokation des CSP-Epitops durch das Adenylatcyclase-Konstrukt zur Präsentation des CSP-Epitops auf MHC I-Molekülen von APZ führt.

Der Salmonellen-Stamm SB824 (pST-TB) und das Adenylatcyclase-Fusionsmolekül ACT-CSP erwiesen sich *in vivo* als effiziente Induktoren einer systemischen CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort. Sowohl in der Milz als auch in der Leber der immunisierten Mäuse konnten antigenspezifische IFN γ -produzierende T-Zellen nachgewiesen werden. Die Stärke der induzierten Immunantwort war nach einmaliger Immunisierung mit ACT-CSP und nach dreimaliger Immunisierung mit SB824 (pST-TB) vergleichbar, und beide Antigenträger erzeugten eine T_H1-basierte Immunantwort. Zudem induzierten beide Immunisierungen eine Memory-Antwort, die durch Effektor-Memory-T-Zellen in der Leber und zentrale Memory-T-Zellen in der Milz gekennzeichnet war. Jedoch war in beiden Fällen die induzierte CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort nicht ausreichend, um die Mäuse vor einer Sporoziten-Infektion zu schützen.

Die primäre CSP-spezifische T-Zellantwort nach Immunisierung mit ACT-CSP ließ sich durch eine weitere Gabe von ACT-CSP nicht steigern. Durch die Blockade jedoch des negativ-regulatorischen Moleküls CTLA-4 (CD152) in Kombination mit einer Zweitimmunisierung mit ACT-CSP konnte eine signifikant gesteigerte CSP-spezifische T-Zellantwort im Vergleich zur alleinigen Immunisierung mit ACT-CSP erreicht werden. Diese Immunisierung erzeugte in nahezu 70% der Mäuse eine protektive Immunität. Sie bot jedoch keinen langfristigen Schutz, obwohl durch die CTLA-4-Blockade auch eine signifikant stärkere Memory-T-Zellantwort und ein höherer Anteil an Effektor-Memory-T-Zellen in der Leber induziert werden konnte.

Als am wirksamsten hat sich die Kombination der beider Antigenträger in einer heterologen *prime/boost*-Immunisierung erwiesen, wobei die Reihenfolge der Immunisierung entscheidend für die Stärke der induzierten Immunantwort war. So führte die dreimalige Applikation des Salmonellen-Stammes *S. typhimurium* SB824 (ST-TB) als Primärimmunisierung gefolgt von einer Zweitimmunisierung mit ACT-CSP zu den stärksten hier erreichten CSP-spezifischen T-Zellantworten und erzeugte eine sterile Immunität in allen immunisierten Mäusen. Ob diese protektive Immunität langfristig besteht, bleibt noch zu untersuchen. Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die erfolgreiche Immunisierung gegen das Leberstadium der Malaria am ehesten durch die Kombination verschiedener Antigenträger in einer heterologen Immunisierung zu erreichen ist.

7 Literatur

Abramson S., Miller R.G., Phillips R.A. (1977): The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J. Exp. Med.* **145**: 1567-1579

Ancsin JB, Kisilevsky R. (2004): A binding site for highly sulfated heparan sulfate is identified in the N terminus of the circumsporozoite protein: significance for malarial sporozoite attachment to hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **279**: 21824-32

Anstey N.M., Weinberg J.B., Hassanali M., Mwaikambo E.D., Manyenga D., Misukonis M.A., Arnelle D.R., Hollis D., McDonald M.I., Granger D.L. (1996): Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J. Exp. Med.* **184**: 557-567

Asano M., Toda N., Sakaguchi N., Sakaguchi S. (1996): Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* **184**: 387-396

Bachmann M., Horn K., Poleganov M.A., Paulukat J., Nold M., Pfeilshifter J., Muhl H. (2006): Interleukin-18 secretion and Th1-like cytokine responses in human peripheral blood mononuclear cells under the influence of the toll-like receptor-5 ligand flagellin. *Cell. Microbiol.* **8**: 289-300

Berenzon D., Schwenk R.J., Letellier L., Guebre-Xavier M., Williams J., Krzych U. (2003): Protracted protection to *Plasmodium berghei* malaria is linked to functionally and phenotypically heterogeneous liver memory CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* **171**: 2024-2034

Capozzo A.V.E., Cuberos L., Levine M.M., Pasetti M.F. (2004): Mucosally delivered *Salmonella* live vector vaccines elicit potent immune responses against a foreign antigen in neonatal mice born to naïve and immune mothers. *Infection and Immunity* **72**: 4637-4646

Carvalho L.H., Sano G.I., Hafalla J.C.R., Morrot A., Curotto de Lafaille M.A., Zavala F. (2002): IL-4-secreting CD4⁺ T cells are crucial to the development of CD8⁺ T cell responses against malaria liver stages. *Nature Medicine* **8**: 166-170

Chatterjee S., Wery M., Sharma P., Chauhan V.S. (1995): A conserved peptide sequence of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein and antipeptide antibodies inhibit *Plasmodium berghei* sporozoite invasion of Hep-G2 cells and protect mice against *P. berghei* sporozoite challenge. *Infection and Immunity* **63**: 4375-4381

- Chaux P., Luiten R., Demotte N., Vantomme V., Stoobant V., Traversari C., Russo V., Schultz E., Cornelis G.R., Boon T., van der Bruggen P. (1999): Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by *in vitro* stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1. *J. Immunol.* **163**: 2928-2936
- Chen W., Jin W., Wahl S.M. (1998): Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor- β (TGF- β) production by murine CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **188**: 1849-1857
- Cheng L.W., Schneewind O. (1999): *Yersinia* type III secretion: on the role of SycE in targeting YopE into HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 22102-22108
- Chizzolini C., Grau G.E., Geinoz A., Schrijvers D. (1990): T lymphocyte interferon gamma production induced by *Plasmodium falciparum* antigen is high in recently infected non-immune and low in immune subjects. *Clin. Exp. Immunol.* **79**: 95-99
- Clark I.A., Rockett K.A., Cowden W.B. (1992): Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria. *Lancet* **340**: 894-896
- Clark I.A., Alleva L.M., Mills A.C., Cowden W.B. (2004): Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. *Clinical Microbiology Reviews* **17**: 509-539
- Clyde D.F., Most H., McCarthy V.C., Vanderberg J.P. (1973): Immunization of man against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am. J. Med. Science* **266**: 169-177
- Collazo C.M., Galan J.E. (1996): Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **64**: 3524-3531
- Confer D.L., Eaton J.W. (1982): Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* **217**: 948-950
- Cooke B.M., Mohandas N., Coppel R.L. (2001): The malaria-infected red blood cell: structural and functional changes. *Advances in Parasitology* **50**: 1-62
- Cornelis G.R., Van Gijsegem F. (2000): Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 735-777
- Crispe E.N., Dao T., Klugewitz K., Mehal W.Z., Metz D.P. (2000): The liver as a site of T cell apoptosis: graveyard or killing field? *Immunol. Rev.* **174**: 47-62

- Czersinsky C.C., Nilsson L.A., Nygren H., Ouchterlony O., Tarkowski A. (1983): A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods* **65**: 109-121
- Dadaglio G., Moukrim Z., Lo-Man R., Sheshko V., Sebo P., Leclerc C. (2000): Induction of a polarized Th1 response by insertion of multiple copies of a viral T cell epitope into adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* **68**: 3867-3872
- DeFranco A.L. (1987): Molecular aspects of B-lymphocyte activation. *Annu. Rev. Cell Biol.* **3**: 143-175
- De Souza J.B., Williamson K.H., Otani T., Playfair J.H.L. (1997): Early γ -interferon responses in lethal and nonlethal murine blood stage malaria. *Infect. Immun.* **65**: 1593-1598
- Dick S., Waterfall M., Currie J., Maddy A., Riley E.M. (1996): Naive human alpha beta T cells respond to membrane-associated components of malaria infected erythrocytes by proliferation and production of interferon gamma. *Immunology* **88**: 412-420
- Domenech V.E., Panthel K., Meinel K.M., Rüssmann H. (2005): Rapid clearance of a recombinant *Salmonella* vaccine carrier prevents enhanced antigen specific CD8 T cell responses after oral boost immunizations. *Microbes Infect.* **7**: 860-866
- Doolan D.L., Sedegah M., Hedstrom R.C., Hobart P., Charoenvit Y., Hoffman S.L. (1996): Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA-immunization: CD8⁺ cell-, interferon gamma- and nitric oxide-dependent immunity. *J. Exp. Med.* **183**: 1739-1746
- El-Azami-El-Idrissi M., Bauches C., Loucka J, Osicka R., Sebo P., Ladant D., Leclerc C. (2003): Interaction of *Bordetella pertussis* adenylatcyclase with CD11b/CD18. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 38514-38521
- Fayolle C., Sebo P., Ladant D., Ullmann A., Leclerc C. (1996): In vivo induction of CTL responses by recombinant adanylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8⁺ T cell epitopes. *J. Immunol.* **156**: 4697-4706
- Fayolle C. Osičkova A., Osička R., Henry T., Rojas M.J., Saron M.F., Sebo P., Leclerc C. (2001): Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* induces protective antiviral immunity. *J. Virol.* **75**: 7330-7338
- Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. (2003): Foxp3 programmes the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**: 330-336
- Galan J.E. (1996): Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20**: 263-271

- Germaine R.N. (1994): MHC-dependent antigen-processing and peptide presentation: Providing ligands for T-lymphocyte activation. *Cell* **76**: 287-299
- Gilbert S.C., Schneider J., Hannan C.M., Hu J.T., Plebanski M., Sinden R., Hill A.V.S. (2002): Enhanced CD8⁺ T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes. *Vaccine* **20**: 1039-1045
- Good M.F., Doolan D.L. (1999): Immune effector mechanisms in malaria. *Current opinion in immunology* **11**: 412-419
- Good M.F. (2001): Towards a blood-stage vaccine for malaria: Are we following all the leads? *Nature Reviews Immunology* **1**: 117-125
- Gray W., Szabos G., Otero A.S., Gray L., Hewlett E. (1998): Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 18260-18267
- Greenwald R.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. (2005): The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* **23**: 515-548
- Greenwood B.M., Vick R.M. (1975): Evidence for a malaria mitogen in human malaria. *Nature* **257**: 592-594
- Gregor P.D., Wolchok J.D., Ferrone C.R., Buchinshky H., Guevara-Patino J.A., Perales M.A., Mortazavi F., Bacich D., Heston W., Latouch J.B., Sadelain M., Allison J.P., Scher H.I., Houghton A.N. (2004): CTLA-4 blockade in combination with xenogeneic DNA vaccines enhances T cell responses, tumor immunity and autoimmunity to self antigens in animal and cellular model systems. *Vaccine* **22**: 1700-1708
- Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P. (2002): CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* **3**: 1097-1101
- Hanahan D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hansen-Wester I., Hensel M. (2001): *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes and Infection* **3**: 549-559
- Hathcock K.S., Laszlo G., Pucillo C., Linsley P., Hodes R.J. (1994): Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* **180**: 631
- Henkart P.A., Catalfamo M. (2004): CD8⁺ effector cells. *Adv. in Immunol.* **83**: 233-252

- Hernandez J., Ko A., Sherman L.A. (2001): CTLA-4 blockade enhances the CTL responses to the p53 self-tumor antigen. *J. Immunol.* **166**: 3908-3914
- Hoiseth S.K., Stocker A.D. (1981): Aromatic dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**: 238-239
- Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. (2003): Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**: 1057-1061
- Hueck C.J. (1998): Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 379-433
- Igwe E.I., Geginat G., Rüssmann H. (2002): Rational concomitant cytosolic delivery of two immunodominant Listerial antigens by *Salmoella enterica* serovar Typhimurium confers superior protection against murine listeriosis. *Vaccine* **70**: 7114-7119
- Janeway C.A.; Travers P., Walport M. (1999): Immunobiology: the immune system in health and disease. 4th Edition, Current Biology Publications, London; Garland Publishing, New York
- Janeway C.A.jr., Medzhitov R. (2002): Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 197
- Johansson C., Wick M.J. (2004): Liver dendritic cells present bacterial antigens and produce cytokines upon *Salmonella* encounter. *J. Immunol.* **172**: 2496-2503
- Jones B.D., Gori N., Falkow S. (1994): *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetration and destroying the specialised epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* **180**: 15-23
- Jovasevic V.M., Gorelik L., Bluestone J.A., Mokr M.B. (2004): Importance of IL-10 for CTLA-4 mediated inhibition of tumor-eradicating immunity. *J. Immunol.* **172**: 1449-1459
- Kimbrough T.G., Miller S.I. (2002): Assembly of the type III secretions needle complex of *Salmonella typhimurium*. *Microbes and Infection* **4**: 75-82
- Klugewitz K., Blumenthal-Barby F., Schrage H., Knolle P.A., Hamann A., Crispe I.N. (2002): Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4⁺ effector cells and suppression of IFN γ producing cells after intravenous protein immunization. *J. Immunol.* **169**: 2407-2413
- Knolle P.A., Limmer A. (2001): Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol.* **22**: 432-437

- Krummel M.F., Allison J.P. (1995): CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* **182**: 459-465
- Krzych U., Schwenk R., Guebre-Xavier M., Sun P., Palmer D., White K., Chalom I. (2000): The role of intrahepatic lymphocytes in mediating protective immunity induced by attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites. *Immunol. Rev.* **174**: 123
- Kubori T., Matsushima Y., Nakamura D., Uralil J., Lara-Tejero M., Sukhan A., Galan J.E., Aizawa S.I. (1998): Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605
- Kursar M., Kohler A., Kaufmann S.H., Mittrücker H.W. (2004): Depletion of CD4+ T cells during immunization with nonviable *Listeria monocytogenes* causes enhanced CD8+ T cell-mediated protection against listeriosis. *J Immunol.* **172(5)**: 3167-72.
- Ladant D., Ullmann A. (1999): *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* **7**: 172-176
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680
- Lanar D.E. (1990): Sequence of the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei* ANKA clone and NK65 strain. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**:151-154
- Lanar D.E., Tine J.A., de Taisne C., Seguin M.C., Cox W.I., Winslow J.P., Ware L.A., Kauffmann E.B., Gordon D., Ballou W.R., Paoletti E., Sadoff J.C. (1996): Attenuated vaccinia virus-circumsporozoite protein recombinants confer protection against rodent malaria. *Infection and Immunity* **64**: 1666-1671
- Lang W., Löscher T. (2000): Tropenmedizin in Klinik und Praxis. 3. Auflage, Stuttgart, New York: Thieme, S. 10-30
- Lemischka I.R., Raulet D.H., Mulligan R.C. (1986): Development potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* **45**: 917-927
- Li C., Seixas E., Langhorne J. (2001): Rodent malarial: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med. Microbiol. Immunol.* **189**: 115-126

- Li S., Rodrigues M., Rodriguez D., Rodriguez J.R., Esteban M., Palese P., Nussenzweig R.S., Zavala F. (1993): Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T cell mediated protective immunity against malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5214-5218
- Limmer A., Ohl J., Wingender G., Berg M., Jüngerkes F., Schumak B., Djandji D., Scholz K., Klevenz A., Hegenbarth S., Momburg F., Hämmeling G.J., Arnold B., Knolle P.A. (2005): Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur. J. Immunol.* **35**: 2970-2981
- Maxam A.M., Gilbert W. (1977): A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 560
- McHugh R.S., Whitters M.J., Piccirillo C.A. (2002): CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* **16**: 311-323
- McNally JM, Zarozinski CC, Lin MY, Brehm MA, Chen HD, Welsh RM (2001): Attrition of bystander CD8 T cells during virus-induced T-cell and interferon responses. *J. Virol.* **75**: 5965-76
- Met O., Wang M., Pedersen A.E., Nissen M.H., Buus S., Claesson M.H. (2006): The effect of a therapeutic dendritic cell-based cancer vaccination depends on the blockade of CTLA-4 signaling. *Cancer Lett.* **231**: 247-256
- Mills k.H., McGuirk P. (2004): Antigen-specific regulatory T cells - their induction and role in infection. *Semin. Immunol.* **16**: 107-117
- Mittrücker H.W., Kaufmann S.H. (2000): Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Leukoc. Biol.* **67**: 457-463
- Mohan K., Moulin P., Stevenson M.M. (1997): Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J. Immunol.* **159**: 4990-4998
- Mosmann T.R., Sad S. (1996): The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today* **17**: 138
- Müller A.K., Labaied M., Kappe S.H.I., Matuschewski K. (2005): Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature* **433**: 164-167

Naik R.S., Branch O.H., Woods A.S., Vijakumar M., Perkins D.J., Nahlen B.L., Lal A.A., Cotter R.J., Costello C.E., Ockenhouse C.F., Davidson E.A., Gowda D.C. (2000): Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J. Exp. Med.* **192**: 1563-1576

Napolitani G., Rinaldi A., Bertonni F., Sallusto F., Lanzavecchia A. (2005): Selected toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* **6**: 769-776

Nussenzweig R.S., Vanderberg J., Most H., Orton C. (1967): Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* **216**: 160-162

Nussenzweig R.S., Vanderberg J., Most H., Orton C. (1970): Immunity in simian malaria induced by irradiated sporozoites. *J. Parasitol.* **56**: 252-257

Ocana-Morgner C., Mot M.M., Rodriguez A. (2003): Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **197**: 143-151

Oliveira-Ferreira J., Caniel-Ribeiro C.T. (2001): Protective CD8⁺ T cell responses against the pre-erythrocytic stages of malaria parasites: an overview. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**: 221-227

Omer F.M., Riley E.M. (1998): Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *J. Exp. Med.* **188**: 39-48

Osička R., Osičkova A., Basar T., Guermonprez P., Rojas M., Leclerc C., Sebo P. (2000): Delivery of CD8⁺ T cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infection and Immunity* **68**: 247-256

Pihlgren M, Dubois PM, Tomkowiak M, Sjogren T, Marvel J. (1996): Resting memory CD8⁺ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *J. Exp. Med.* **184**: 2141-2151

Plebanski M. Gilbert S.C., Schneider J., Hannan C.M., Layton G., Blanchard T., Becker M., Smith G., Butcher G., Sinden R.E., Hill A.V.S. (1998): Protection from *Plasmodium berghei* infection by priming and boosting T cells to a single class I restricted epitope with recombinant carriers suitable for human use. *Eur. J. Immunol.* **28**: 4345-4355

Potsch C., Vohringer D., Pircher H. (1999): Distinct migration patterns of naive and effector CD8 T cells in the spleen: correlation with CCR7 receptor expression and chemokine reactivity. *Eur. J. Immunol.* **29**: 3562-3570

Prasad S.J., Farrand K.J., Matthews S.A., Chang J.H., McHugh R.S., Ronchese F. (2005): Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **174**: 90-98

Renggli J., Hahne M., Matile H., Betschart B., Tschopp J., Corradin G. (1997): Elimination of *P. berghei* liver stages is independent of Fas (CD95/Apo-1) or perforin-mediated cytotoxicity. *Parasite Immunology* **19**: 145-148

Riley E.M., Jakobsen P.H., Allen S.J., Wheeler J.G., Bennet S., Jepsen S., Greenwood B.M. (1991): Immune response to soluble exoantigens of *Plasmodium falciparum* may contribute to both pathogenesis and protection in clinical malaria: evidence from a longitudinal, prospective study of semi-immune African children. *Eur. J. Immunol.* **21**: 1019-1025

Riley E.M. (1999): Is T-cell priming required for initiation of pathology in malaria infections? *Immunology today* **20**: 228-233

Rockett K.A., Awburn M.M., Rockett E.J., Cowden W.B., Clark I.A. (1994): Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. *Parasite Immunol.* **16**: 243-249

Rodrigues E.G., Zavala F., Eichinger D., Wilson J.M., Tsuji M. (1997): Single immunizing dose of recombinant adenovirus efficiently induces CD8+ T cell mediated protective immunity against malaria. *J. Immunol.* **158**: 1268

Romero P., Maryanski J.L., Corradin G., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V., Zavala F. (1989): Cloned cytotoxic T cells recognized an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* **341**: 323-325

Rose T., Sebo P., Bellalou J., Ladant D. (1995): Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* **270**: 26370-26376

Rosen S.D. (2004): Ligands for L-Selectin: homing, inflammation and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* **22**: 129-156

Rosqvist R., Hakansson S., Forsberg A., Wolf-Watz H. (1995): functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of *Yersiniae*, *Salmonellae* and *Shigellae*. *EMBO J.* **14**: 4187

Royle M.C., Totemeyer S., Allridge L.C., Maskell D.J., Bryant C.E. (2003): Stimulation of Toll-like receptor 4 by lipopolysaccharide during cellular invasion by live *Salmonella typhimurium* is a critical but not exclusive event leading to macrophage responses. *J. Immunol.* **170**: 5445-5454

- Rüssmann H., Shams H., Poblete F., Fu Y., Galan J.E., Donis R.O. (1998): Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. *Science* **281**: 565-568
- Rüssmann H., Igwe E.I., Sauer J., Hardt W.D., Bubert A., Geginat G. (2001): Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing hybrid *Yersinia* type III proteins. *J. Immunol.* **167**: 357-365
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487
- Sakaguchi S. (2005): Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **6**: 345-352
- Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. (2004): Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**: 745-763
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Schellenberg D., Menendez C., Aponte J.J., Kahigwa E., Tanner M., Mshinda H., Alonso P. (2005): Intermittent preventive treatment for tanzanian infants: follow up to age 2 years of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **365**: 1481-1483
- Schlecht G., Loucka J., Najjar H., Sebo P., Leclerc C. (2004): Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4+ and CD8+ T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *J. Immunol.* **173**: 6089-6097
- Schneider J., Gilbert S.C., Blanchard T.J., Hanke T., Robson K.J., Hannan C.M., Becker M., Sinden R., Smith G.L., Hill A.V.S. (1998): Enhanced immunogenicity for CD8⁺ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nature Medicine* **4**: 397-402
- Schofield L., Villaquiran J., Ferreira A., Schellekens H., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V. (1987): γ interferon CD8⁺ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* **330**: 664-666
- Schofield L., Hackett F. (1993): Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J. Exp. Med.* **177**: 145-153

- Schwartz R.H. (2005): Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat. Immunol.* **6**: 327-330
- Sedegah M., Hedstrom R., Hobart P., Hoffman S.L. (1994): Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9866
- Shams H., Poblete F., Rüssmann H., Galán J.E., Donis R.O. (2002): Induction of specific CD8+ memory T cells and long lasting protection following immunization with *Salmonella typhimurium* expressing a lymphocytic choriomeningitis MHCclass I restricted epitope. *Vaccine* **20**: 577-585
- Shea J.E., Hensel M., Gleeson C., Holden D.W. (1996): Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2593-2597
- Shevach E.M. (2000): Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 423-449
- Smith J.D., Chitnis C.E., Craig A.G., Roberts D.J., Hudson-Taylor D.E., Peterson D.S., Pinches R., Newbold C.I., Miller L.H. (1995): Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlates with changes in antigenic and cytoadherent phenotype of infected erythrocytes. *Cell* **82**: 101-110
- Sory M.P., Boland A., Lambermont I., Cornelis G.R. (1995): Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1998-2002
- Spertini O, Luscinskas FW, Kansas GS, Munro JM, Griffin JD, Gimbrone MA Jr, Tedder TF (1991): Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *J Immunol* **147**: 2565
- Spertini O, Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr, Tedder TF (1992): Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under nonstatic conditions. *J Exp Med* **175**: 1789
- Sprent J., Surh C.D. (2002): T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 551-79
- Squier M.K.T., Cohen J.J. (1994): Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 447-452
- Stevenson M.M., Riley E.M. (2004): Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology* **4**: 169-180
- Tachado S.D., Gerold P., Schwarz R., Novakovich S., McConville M., Schofield L. (1997): Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma* and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4022-4027

- Takahashi T., Tagami T., Yamzaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W., Sakaguchi S. (2000): Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* **192**: 303-310
- Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD (2002): Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *J. Exp. Med.* **195**: 1523-32
- Tartz S., Kamanova J., Simsova M., Sebo P., Bolte S., Heussler V., Fleischer B., Jacobs T. (2006): Immunisation with a circumsporozoite epitope fused to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase in conjunction with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade confers protection against *Plasmodium berghei* liver-stage malaria. *Infection and Immunity* **74**: 2277-2285
- Toka F.N., Suvas S., Rouse B.T. (2004): CD4⁺ CD25⁺ T cells regulate vaccine-generated primary and memory CD8⁺ T cell responses against Herpes Simplex Virus type I. *J. Virol.* **78**: 13082-89
- Tsuji M., Bergmann C.C., Takita-Sonoda Y., Murata K., Rodrigues E.G., Nussenzweig R.S., Zavala F. (1998): Recombinant Sindbis viruses expressing a cytotoxic T-lymphocyte epitope of a malaria parasite or of influenza virus elicit protection against the corresponding pathogen in mice. *J. Virol.* **72**: 6907
- Urban B.C., Ferguson D.J., Pain A., Willcox N., Plebanski M., Austyn J.M., Roberts D.J. (1999): *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* **400**: 73-77
- Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B., Bluestone J.A. (1994): CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1**: 405-413
- Weiss A., Littman D.R. (1994): Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**: 263-274
- White K.L., Jarboe D.L., Krzych U. (1994): Immunization with irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites induces IL-2 and IFN- γ but not IL-4. *Parasite Immunology* **16**: 479-491
- World Health Organization (1999): WHO report on infectious diseases: removing obstacles to healthy development
- Xu H., Wipasa J., Yan H., Zeng M., Makobongo M.O., Finkelman F.D., Kelso A., Good M.F. (2002): The mechanisms and significance of deletion of parasite-specific CD4⁺ T cells in malaria infection. *J. Exp. Med.* **195**: 881-892

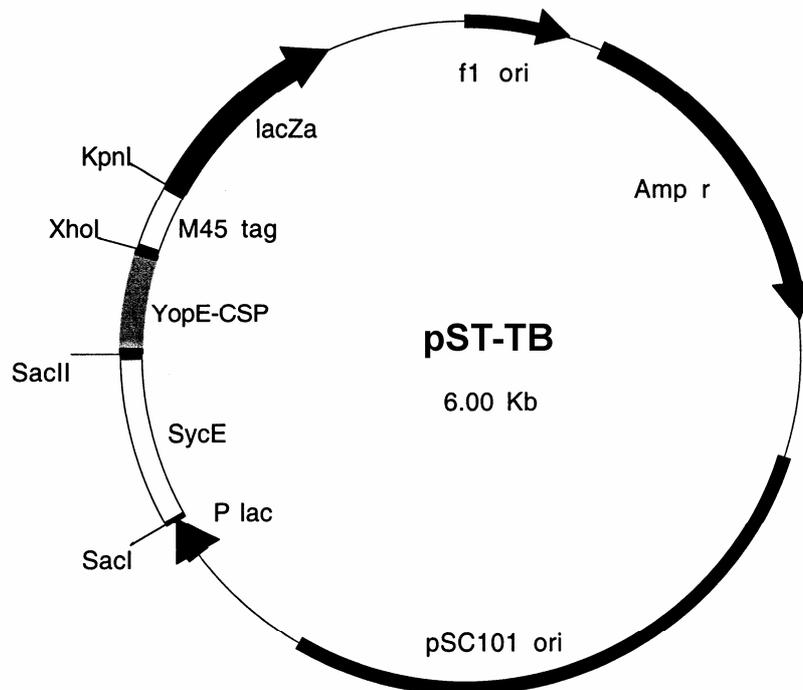
Anhang I: DNA-Sequenz *P. berghei* CSP (Vektor pSG-pbCSP)

ATGAAGAAGTGTACCATTTTAGTTGTAGCGTCACTTTTATTAGTTAATTC	50
TCTACTTCCAGGATATGGACAAAATAAAAGCATCCAAGCCCAAAGGAACT	100
TAAACGAGCTATGTTACAATGAAGGAAATGATAATAAATTGTATCACGTG	150
CTTAACTCTAAGAATGGAAAAATATACATACGAAATACAGTCAACAGATT	200
ACTTGCCGATGCTCCCGAAGGAAAAAAAAATGAGAAAAAAAAACAAAATAG	250
AGCGTAATAATAAATTGAAACAACCACCACCACCACCAAACCCAAATGAC	300
CCACCACCACCAAACCCAAATGACCCACCACCACCACCAAACCCAAATGACCC	350
ACCACCACCACCAAACCCAAATGACCCACCACCACCACCAAACCCAAATGACCCAC	400
CACCACCACAAACGCAAATGACCCACCACCACCACCAAACGCAAATGACCCAGCA	450
CCACCAAACGCAAATGACCCAGCACCACCACCAAACGCAAATGACCCAGCACC	500
ACCAAACGCAAATGACCCACCACCACCACCAAACGCAAATGACCCACCACCAC	550
CAAACCCAAATGACCCAGCACCACCACCAAACGCAAATGACCCACCACCACCA	600
AACCCAAATGACCCAGCACCACCACAAGGAAATAACAATCCACAACCACA	650
GCCACGGCCGCAGCCACAACCACAGCCACAGCCACAACCACAGCCACAGC	700
CACAACCACAGCCACGACCACAGCCACA <u>ACCACAGCCAGGTGGTAATAAC</u>	750
AATAACAAAAATAATAATAATGACGATTCTTATATCCCAAGCGCGGAAAA	800
AATACTAGAAATTTGTTAAACAGATCAGGGATAGTATCACAGAGGAATGGT	850
CTCAATGTAACGTAACATGTGGTTCTGGTATAAGAGTTAGAAAACGAAAA	900
GGTTCAAATAAGAAAGCAGAAGATTTGACCTTAGAAGATATTGATACTGA	950
AATTTGTAAAATGGATAAATGTTCAAGTATATTTAATATTGTAAGCAATT	1000
CATTAGGATTTGTAATATTATTAGTATTAGTATTCTTTAATTAA	1050

|→ s-CSPI-BamHI

as-CSPI-XhoI/SalI ←|

Anhang III: Vektor pST-TB



Plasmid: pST-TB

Größe: 6,0 kb

Insert: *Y. enterocolitica* SycE; *Y. enterocolitica* YopE₁₋₁₃₈ - *P. berghei* CSP₂₃₁₋₂₆₀; M45 Tag

Referenz: pWSK29-Derivat (Wang et al., 1991)