T-Zellantwort nach *Salmonella typhimurium*-Infektion im Mausmodell

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Sabine Seibert
aus München

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:
Vorsitzender: Prof. Dr. Ulf Stahl
Berichter: Prof. Dr. Roland Lauster
Berichter: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 24.1.2007

Berlin 2007
D 83

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis IV

1 Einleitung 1

1.1 Das Immunsystem 1

1.2 Das angeborene Immunsystem 2

1.2.1 Zellen des angeborenen Immunsystems 2

1.2.1.1 Makrophagen 3
1.2.1.2 Neutrophile Granulozyten 4
1.2.1.3 Dendritische Zellen 5
1.2.1.4 NK-Zellen 5

1.2.2 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems 6

1.2.2.1 TLR (Toll-like Receptors) 8
1.2.2.2 TLR-Signalübertragung 9

1.3 Das erworbene Immunsystem 12

1.3.1 Antigen-Präsentation 12

1.3.1.1 MHC-Klasse-II-Moleküle 13
1.3.1.2 MHC-Klasse-I-Moleküle 13

1.3.2 B-Zellen 14

1.3.3 T-Zellen 16

1.3.3.1 $CD8^+$ T-Zellen 17
1.3.3.2 $CD4^+$ T-Zellen 18

1.4 Die Salmonellen-Infektion 22

1.4.1 *Salmonella eneterica*-Infektionen 22

1.4.2 *Salmonella typhimurium*-Infektion im Mausmodell 23

1.4.3 T-Zellantwort nach *Salmonellen*-Infektion 24

2 Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung 26

3 Material 27

3.1 Geräte und Materialien 27

3.2 Reagenzien 28

3.3 Software Programme 29

3.4 Medien und Puffer 29

3.4.1 Puffer / Lösungen und Medien für Zellaufbereitung 29
3.4.2 Lösungen für ELISA 30
3.4.3 Medium für Bakterienkultur 30

3.5 Antikörper 30

3.6 Versuchstiere 32

4 Methoden 33

4.1 Bakterielle Zellkultur 33

4.2 Infektion von Mäusen 33

4.3 Makroskopische Untersuchung der Milz und Bakterientiterbestimmung 34

4.4 Zellfärbung und Zellanalyse am Durchflusszytometer 34

4.4.1 Isolation von Lymphozyten aus der Milz 34
4.4.2 Oberflächenfärbung von Milzzellen 34
4.4.3 Intrazelluläre Zytokin-Färbung 34
4.4.4 Aufreinigung von $CD8^+$ T Zellen mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung (MACS) 35
4.4.5 Adoptiver Transfer von Milzzellen 36
4.4.6 Färbung von Milzzellen mit MHC-Klasse-I-Tetrameren 36
4.4.7 CFSE-Markierung von Zellen 37
4.4.8 Messung und Analyse 37

4.5 Antikörper-Bestimmung aus murinem Serum 37

4.5.1 Gewinnung von Serum aus murinem Blut 37
4.5.2 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) zur Detektion *Salmonellen*-spezifischer Antikörper 38

4.6 Apoptose Assay 39

4.7 Quantitative Reverse Transkriptase PCR 39

4.7.1 Isolierung und Aufreinigung von RNA aus Zellgewebe 39
4.7.2 cDNA-Synthese 40

4.8 Real-time quantitative PCR 40

4.9 Graphische Darstellung und Statistik 41

5 Ergebnisse 42

5.1 TLR-unabhängige, erworbene Immunantwort nach Infektion mit *S. typhimurium* 42

5.1.1 Infektionsverlauf nach Infektion von TLR2-, TLR4-, TLR2+4- undMyD88-defizienten Mäusen mit SL7207OVA 43

5.1.2 Zunahme in Milzgröße und –zellularität nach *S. typhimurium*-Infektion 46

5.1.3 $TLR2^{-/-}$-Mäuse, $TLR4^{-/-}$-Mäuse, $TLR2+4^{-/-}$-Mäuse und $MyD88^{-/-}$-Mäuse generieren eine *Salmonellen*-spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort 49

5.1.4 $CD4^+$ T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen, $TLR2^{-/-}$-Mäusen, $TLR4^{-/-}$-Mäusen, $TLR2+4^{-/-}$-Mäusen und $MyD88^{-/-}$-Mäusen produzieren IFN-γ nach Infektion mit *S. typhimurium* 53

5.1.5 TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse generieren eine humorale Immunantwort nach *S. typhimurium*-Infektion 55

5.1.6 Zytokin- und Chemokin-Genexpression nach *S. typhimurium*-Infektion 57

5.2 Analyse der frühen T-Zellaktivierung nach *Salmonellen*-Infektion in C57BL/6-Mäusen 61

5.2.1 Aktivierung naiver endogener und transferierter $CD8^+$ T-Zellen nach Infektion mit *S. typhimurium* 62

5.2.2 Analyse potentieller Mediatoren der TZR-unspezifischen $CD8^+$ T-Zellaktivierung nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium*. 68

5.2.3 Apoptose-Induktion in transferierten und endogenen T-Zellen nach Infektion mit virulenten *Salmonellen* 70

5.2.4 Zytokin-Sekretion nach Infektion mit virulenten *Salmonellen* 73

5.2.5 *S. typhimurium* induziert nach Infektion eine Immunsuppression 77

6 Diskussion 79

6.1 TLR-unabhängige, erworbene Immunantwort nach *S. typhimurium*-Infektion 79

6.1.1 TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse überleben die Infektion mit *S. typhimurium* SL7207OVA 82

6.1.2 Die $CD4^+$ T-Zellantwort nach *S. typhimurium* Infektion verläuft unabhängig von TLR2, TLR4 und MyD88 87

6.1.3 TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse generieren eine spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort 91

6.1.4 TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse bilden nach *S. typhimurium*-Infektion eine humorale Immunantwort 93

6.1.5 Zytokinprofil an Tag 10 nach *S. typhimurium* Infektion 95

6.1.6 Schlussfolgerung und Ausblick 98

6.2 Frühe, Antigen-unabhängige T-Zellaktivierung nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* **100**

6.2.1 Charakterisierung der $CD8^+$ T-Zellaktivierung nach Infektion mit *S. typhimurium* 101

6.2.2 Charakterisierung der $CD8^+$ T-Zellfunktion nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* 102

6.2.3 Apoptose-Induktion in $CD8^+$ T-Zellen nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* 105

6.2.4 Die Infektion mit virulenten *S. typhimurium* induziert eine Immunsuppression in C57BL/6-Mäusen 106

6.2.5 Vermittlung der TZR-unspezifischen T-Zellaktivierung 107

6.2.6 Schlussfolgerung und Aussicht 109

7 Zusammenfassung **111**

8 Summary **112**

9 Literaturverzeichnis **113**

10 Anhang **123**

9.1 Herstellernachweis **123**

9.2 Danksagung **128**

9.3 Lebenslauf **129**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AS	Aminosäure
Ak	Antikörper
Ag	Antigen
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	Professionelle antigenpräsentierende Zelle
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C57BL/6	Wildtyp-Mausstamm
CD #	Differenzierungscluster: Internationale Nomenklatur für Zell-oberflächen Moleküle (CD Nummer)
Cy	Indodicarbocyanin
Cy5	Cy-Chrome 5, Fluoreszenz-Farbstoff in der Durchflusszytometrie
Cy7	Cy-Chrome 7, Fluoreszenz-Farbstoff in der Durchflusszytometrie
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	“Forward scatter” = Vorwärtsstreulicht
Gr.	Gramm
HVGD	„Host versus Graft Diesease“ Bezeichnung für die Abstoßung eines allogenen Transplantats
IFN-γ	Interferon-γ

IFN-$\gamma^{-/-}$	Interferon-γ defiziente Maus; C57BL/6 Mausstamm mit einer Deletion im IFN-γ Lokus
IFN-$\gamma R^{-/-}$	Interferon-γ-Rezeptor- defiziente Maus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
L.	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
M	mol pro Liter
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} L)
u.a.	unter anderem
µl	Mikroliter (10^{-6} L)
µg	Mikrogramm (10^{-6} Gr.)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	messenger RNA
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NK-Zellen	natürliche Killerzelle
OVA	Ovalbumin (Hühnerei-Albumin)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin, Fluoreszenz-Farbstoff in der Durchflusszytometrie
PI	Propidiumjodid
RT	Reverse Transkriptase
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulphat, Detergenz
SSC	“Sideward scatter” = Seitwärtsstreulicht

Tab.	Tabelle
tg.	transgen
TSB	Tryptic Soy Broth
TZR	T-Zell Rezeptor
T_H1	T-Helfer-Zelle Typ 1
T_H2	T-Helfer-Zelle Typ 2
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U/min	Umdrehung pro Minute
Wt.	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Wichtige Aufgaben des Immunsystems sind die Verteidigung des Körpers gegen eindringende Mikroorganismen, der Aufbau der Immunantwort und die Entwicklung des immunologischen Gedächtnisses. Mit Hilfe von spezifischen Rezeptoren aber auch Mustererkennungsrezeptoren kann das Immunsystem eindringende Mikroorgansimen erkennen und abwehren. Das Immunsystem der Säugetiere umfasst neben dem phylogenetisch wesentlich älteren, angeborenen Immunsystem, das entwicklungsgeschichtlich jüngere, erworbene Immunsystem. Beide Arme des Immunsystems setzen sich sowohl aus zellulären als auch aus humoralen Komponenten zusammen. Alle Zellen des Immunsystems gehen aus hämatopoetischen, pluripotenten Stammzellen hervor. Man unterscheidet hierbei zwischen lymphatischen und myeloischen Vorläuferzellen. Zellen aus der lymphatischen Reihe sind die T- und B-Lymphozyten aber auch NK-Zellen. Deren Entwicklung, die Lymphopoese, findet im Knochenmark statt. Hier reifen Pro-B-Zellen heranreifen, differenzieren und können als B-Zellen lymphatische Organe besiedeln. Auch Pro-T-Lymphozyten reifen im Knochenmark heran, diese wandern jedoch in den Thymus wo sie nach Positiv- und Negativ-Selektionierung den Status als voll-funktionsfähige T-Zellen erhalten. Aus der myeloischen Reihe gehen u.a. Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Erythozyten und Thrombozyten hervor. Diese Zellen entstehen im Knochenmark und gelangen über das Blut in verschiedene Gewebe. Je nach Gewebe können sich einige Zelltypen der myeloischen Reihe noch weiter differenzieren.

Neben den erwähnten zellulären Komponenten spielen auch lösliche Komponenten eine wichtige Rolle im Immunsystem. Von entscheidender Bedeutung für das Immunsystem sind die Botenstoffe, die die Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren umfassen. Darüber hinaus gibt es aber auch weitere lösliche Komponenten, die direkt mit den Mikroorganismen oder deren Antigenen interagieren. Beispielsweise kann die Opsonierung eingedrungener Mikroorgansimen durch Bestandteile des Komplementsystems zur Internalisierung

der Mikroorganismus durch Phagozyten aber auch zu deren direkter Zerstörung führen. Antikörper gegen mikrobielle Strukturen von Mikroorganismen können diese neutralisieren, und so deren Wirkung blockieren.
Entscheidend für eine erfolgreiche Immunantwort sind die Rezeptoren, die mikrobielle Bestandteile erkennen. Zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem existieren hierbei Unterschiede. Während das angeborene Immunsystem invariable Rezeptoren gegen konservierte Strukturen der Mikroorganismen aufweist, besitzen Zellen des erworbenen Immunsystems theoretisch die Möglichkeit gegen alle mikrobiellen Antigene Rezeptoren zu entwickeln.

1.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem dient der frühen Erkennung mikrobieller Strukturen und der sofortigen Reaktion auf die Mikroorganismen. An der Infektionsabwehr des angeborenen Immunsystems sind unterschiedliche Zellen und Moleküle beteiligt. Diese spielen in der Restriktion der Pathogenvermehrung und der Beseitigung aus dem Wirtsorganismus eine wichtige Rolle. Zusätzlich zur Wahrnehmung, Markierung und Beseitigung der Mikroorgansimen dient das angeborene Immunsystem zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems, um neben einer schnellen aber relativ unspezifischen Immunantwort eine hochspezifische Immunantwort zu generieren. Die Interaktion zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem erfolgt dabei Zell-Zell vermittelt oder durch lösliche Mediatoren wie z.B. Zytokine und Chemokine. Ein wesentliches Merkmal der angeborenen Immunantwort ist, dass es kein immunologisches Gedächtnis entwickelt und auf ein Pathogen, das wiederholt in den Körper eindringt immer in gleicher Weise reagiert.

1.2.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Das angeborene Immunsystem ist beim ersten Kontakt mit Mikroorganismen einsatzbereit und kann apathogene aber auch potentiell pathogene Mikroorganismen eliminieren. Durch diese schnelle Einsatzbereitschaft wird eine Streuung der

Infektion auf weitere Gewebe des Wirtes unterbunden. Zudem präsentieren spezialisierte Zellen des angeborenen Immunsystems den Zellen des erworbenen Immunsystems Antigene aus den Mikroorganismen. Dadurch wird eine spezifische Immunantwort initiiert.

An der angeborenen Immunantwort sind unter anderem Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, Dendritische Zellen (DC), und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) beteiligt. Als Phagozyten sind Monozyten / Makrophagen und Neutrophile Granulozyten von entscheidender Bedeutung, da sie Mikroorganismen aufnehmen und eliminieren können. Für die Präsentation mikrobieller Peptide und die damit verbundene Aktivierung des erworbenen Immunsystems spielen hingegen Dendritische Zellen eine herausragende Rolle.

1.2.1.1 Makrophagen

Makrophagen gehen aus Monozyten hervor, die den Blutstrom verlassen haben und in Gewebe einwandern. Gewebespezifische Makrophagen sind in vielen Organen, so auch in der Lunge, dem Gehirn, dem Bindegewebe, dem Verdauungstrakt, der Milz und Leber zu finden. In der Leber werden die residenten Makrophagen Kupffer-Sternzellen genannt.

Makrophagen erkennen Mikroorganismen über spezielle Strukturerkennungs-rezeptoren auf der Zelloberfläche aber auch durch intrazelluläre Strukturerkennungsrezeptoren. Diese Rezeptoren sind für die weitere Immunantwort wichtig, da sie nach Bindung mikrobieller Strukturen Signalkaskaden in Gang setzen, die zur Produktion und Sezernierung von Zytokinen und Chemokinen führen. Diese wiederum wirken auf die Zellen des angeborenen Immunsystems als auch auf die des adaptiven Immunsystems, und können so z.B. eine lokale Entzündung induzieren und langfristig zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems führen.

Die Erkennung von Mikroorganismen führt zur Aktivierung von Phagozyten und der Aufnahme der Mikroorgansimen, die dann in den Phagozyten abgebaut werden. Hierbei befindet sich der Mikroorganismus, wie in Abb. I dargestellt, zuerst in einer endozytotischen Vakuole. Dieses Endosom beinhaltet endosomale Proteasen, die durch den neutralen pH-Wert inaktiv sind. Im Folgenden wird der pH-Wert in den Endosomen sukzessiv verringert. Cathepsin-Proteasen werden in saurem Milieu

aktiv und sind neben weiteren Proteasen an der Zerstörung und dem Abbau der Mikroorgansimen beteiligt. Zusätzlich zu den Hydrolasen besitzen Makrophagen und Neutrophile weitere Mechanismen um Mikroorganismen abzubauen. Diese Mechanismen werden in Makrophagen, durch Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und Interferon-γ (IFN-γ) induziert. So produzieren aktivierte Makrophagen zur Pathogenabwehr Hyperoxid-Anionen, Hydroxyl-Radikale, Hypochlorsäure und Stickstoffmonoxid, die im Zusammenspiel starke mikrobizide Wirkung besitzen. Außerdem führt die Aktivierung durch IFN-γ zur schnelleren Reifung der Phagolysosomen und damit zum beschleunigten Abbau phagozytierter Mikroorganismen.

Darüber hinaus kann ein Teil der Phagozyten (DCs und Makrophagen) prozessierte Antigenpeptide über MHC-Klasse-I und -II-Moleküle präsentieren. Eine Eigenschaft, die vor allem für die Funktion von Dendritischen Zellen zutrifft und den Interaktionspunkt mit dem adaptiven Immunsystem darstellt..

Makrophagen und Monozyten, die zumeist die ersten Zellen des Immunsystems an der Infektionsstelle darstellen, sezernieren Chemokine um weitere Phagozyten zu rekrutieren. Insbesondere Neutrophile migrieren in großen Mengen chemotaktisch an den Infektionsort.

1.2.1.2 Neutrophile Granulozyten

Die zweite große Gruppe der Phagozyten stellen die Neutrophilen Granulozyten dar. Neutrophile migrieren nach Stimulus durch Chemokine aus dem Blutstrom in das umliegende Gewebe und wandern entlang des Chemokin-Gradienten zum Infektionsort. Bei diesen Vorgängen sind die Chemokine der CXC-Gruppe von besonderer Bedeutung, da sie neben dem Rekrutieren auch die Aktivierung der Neutrophile vermitteln.

Aktivierte Neutrophile Granulozyten können über Exozytose von azurophilen Granula, über Bindegewebe und Fibrinogenmaterial hinweg zu eingedrungenen Mikrorganismen gelangen, wo sie durch Ausschüttung von weiteren Granula die Mikroorganismen abtöten. Die Granula der Neutrophilen beinhalten für diesen Vorgang saure Hydrolasen, Defensine, Myeloperoxidasen und Proteasen. Zudem

besitzen Neutrophile weitere Vakuolen, die Laktoferrin und Lysozym beinhalten und bakterizid wirken.

1.2.1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind die professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) des Immunsystems. DCs nehmen eine zentrale Funktion beim Initiieren der erworbenen Immunantwort ein (Liu *et al.*, 2001;Mellman and Steinman, 2001) . Unreife DCs, d.h. Zellen die nur wenig MHC-Moleküle und keine co-stimulatorischen B7-Proteine (CD80 und CD86) aufweisen, sind zumeist in Oberflächenepithelien (z.B. in der Haut und den Schleimhäuten) zu finden. In der Haut werden DCs Langerhanszellen genannt. Nach Phagozytose eindringender Mikroorganismen migrieren DCs zu den nächstgelegenen lymphatischen Organen, meist Lymphknoten. Diese Migration kann auch durch Zytokine induziert werden. Auf der Wanderung zu den Lymphknoten findet eine Reifung der DCs statt, so dass die Präsentation von MHC-Peptid-Komplexen verlängert und verstärkt stattfindet. DCs präsentieren in den Lymphknoten und in der Milz prozessierte Peptide aufgenommener Mikroorgansimen über MHC-Klasse-I- oder –II-Moleküle und aktivieren Zellen des erworbenen Immunsystems. Zusätzlich können reife DCs eine starke co-stimulierende Wirkung auf T-Zellen ausüben. Als professionelle Antigen-präsentierende Zellen sind DCs jedoch nicht mehr in der Lage Mikroorgansimen aufzunehmen und dienen ausschließlich der Stimulation von Zellen des adaptiven Immunsystems. Reife DCs sind hierbei die stärksten Stimulatoren naiver T-Zellen(Lanzavecchia and Sallusto, 2001). Wie Makrophagen können auch DCs über IFN-γ und TNF-α, die im Zuge einer Infektion freigesetzt werden, zusätzlich aktiviert werden.

1.2.1.4 NK-Zellen

NK-Zellen, die wie T- und B-Zellen aus lymphatischen Vorläuferzellen entstehen, besitzen keinen T- oder B-Zellrezeptor und gehören zum angeborenen Immunsystem. NK-Zellen werden durch Bindung ihrer NK-Rezeptoren und durch Zytokine, etwa IFN-α, IFN-β, IL-12 und IFN-γ, die im Rahmen der Infektion

sezerniert werden, aktiviert. Sie können Zellen, die bestimmte NK-Rezeptorliganden-Kombinationen aber auch Zellen die keine MHC-I Moleküle mehr zeigen, wie einige Tumorzellen, töten. Die zytotoxische Eigenschaft von NK-Zellen wird über eine Reihe von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren modelliert. Der zytotoxische Mechanismus ist in NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten ähnlich und basiert auf der Ausschüttung zytotoxischer Granula. Diese Granula beinhalten neben Perforin auch unterschiedliche Granzyme. In Zielzellen induzieren diese Effektorproteine den sofortigen Zelltod. NK-Zellen haben daneben die Möglichkeit über Perforin-unabhängige Mechanismen die Zielzellen zu töten. Dazu zählt neben Fas-Ligand-induzierter Apoptose auch die über TNF oder TRAIL (TNF-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand)-eingeleitete Apoptose.
NK-Zellen sezernieren nach Aktivierung Botenstoffe, die neben IFN-γ auch TNF-α, Monozyten-, Makrophagen- und T-Zellen-rekrutierende Chemokine wie z.B. CCL-3 und CCL-5 umfassen (Cerwenka and Lanier, 2001;Orange and Ballas, 2006).

1.2.2 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Eindringende Mikroorganismen werden direkt oder nach Bindung durch lösliche Komponenten des Immunsystems (Opsonisierung) über eine Vielzahl von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt. Die Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr sind vollständig in der Keimbahn festgelegt. Sie weisen somit eine genetisch vorbestimmte Spezifität auf und besitzen ein deutlich eingeschränktes Repertoire im Vergleich zu Rezeptoren des erworbenen Immunsystems. Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkennen Muster, die auf vielen Mikroorganismen vorkommen. Neben Rezeptoren für Zuckerstrukturen (z.B. Mannoserezeptoren), sind vor allem TLR (Toll-like Receptors) für die Erkennung der Pathogene verantwortlich. Zusätzlich dazu spielen die Bestandteile des Komplementsystems eine wesentliche Rolle in der Erkennung von Mikroorganismen. Das Komplementsystem setzt sich aus verschiedenen Plasmaproteinen zusammen, deren Hauptaufgabe es ist, die Oberfläche von Mikroorgansimen zu bedecken. Die Erkennung der abgelagerten Komplementkomponenten durch Phagozyten erleichtert dann die Zerstörung dieser Keime. Daneben können Komplementproteine an der Ausbildung einer

Entzündungsreaktion beteiligt sein, die die Immunabwehr in der Verteidigung gegen die Infektion unterstützt. Das Komplementsystem wird über unterschiedliche Mechanismen aktiviert. Neben dem klassischen, Antikörper-vermittelten Weg, existiert der spontane und Antikörper-unabhängige, alternative Weg. Zusätzlich gibt es den Lektin-Weg, der über Mannose-bindendes Lektin aktiviert wird. Das Ergebnis dieser unterschiedlichen Komplement-Aktivierung ist die Bildung der C3-Konvertase. Diese Serin-Protease löst eine Spaltungskaskade aus, in deren Folge Leukozyten chemotaktisch angelockt werden. Zusätzlich wird eine verstärkte Phagozytoseaktivität in den Phagozyten ausgelöst Die Komplementproteine C3b oder C5b binden hierbei an Komplementrezeptoren, u.a. CR1 auf der Oberfläche von professionellen Phagozyten. Erst dann wird die Phagozytose der von den Komplementproteinen opsonierte Mikroorganismen angeregt. Die Fragmente einiger Komplementproteine (z.B. C5a) wirken als Chemoattraktoren, die weitere Phagozyten zum Infektionsort locken. Eine weitere Funktion ist die direkte Zerstörung von Mikroorgansimen und besonders Bakterien, durch das Einfügen von Poren in die Zelloberfläche der Mikroorgansimen.

Makrophagen und Neutrophile besitzen Antikörperrezeptoren mit denen sie IgG-bedeckte Mikroorganismen erkennen und phagozytieren können (McKenzie and Schreiber, 1998;Underhill and Ozinsky, 2002). Mikroorgansimen können jedoch auch über eine Reihe weiterer Rezeptoren auf der Oberfläche von phagozytierenden Zellen wahrgenommen werden. So exprimieren Makrophagen neben Mannoserezeptoren und Glucanrezeptoren auch Scavengerrezeptoren, die mikrobielle Strukturen erkennen und die Phagozytose einleiten können. Mannoserezeptoren sind Transmembranproteine die als Calcium-abhängige Lektine bakterielle und virale Kohlenhydratketten erkennen und direkt die Phagozytose der gebundenen Strukturen einleiten (Aderem and Underhill, 1999;Apostolopoulos and McKenzie, 2001). Scavengerrezeptoren hingegen binden an anionische Polymere und azetylierte Lipoproteine geringer Dichte, die auf körpereigenen Zellen von Sialinsäureresten, verdeckt sind. Auch hier führt die Bindung zur Phagozytose (Underhill and Ozinsky, 2002).

1.2.2.1 TLR (Toll-like Receptors)

Diese Gruppe von Strukturerkennungsrezeptoren wurde erst vor wenigen Jahren entdeckt. TLR besitzen zusammen mit ihren intrazellulären Signalwegen eine essentielle Bedeutung für eine adäquate Immunreaktion nach Infektion (Beutler *et al.*, 2006;Medzhitov and Janeway, Jr., 2000). Bereits 1995 wurden in *Drosophila melanogaster* Immundefizienzgene (imd-Gene) entdeckt, die für das Erkennen von Gram-negativen Bakterien wichtig sind (Lemaitre *et al.*, 1995). Kurz darauf konnte ebenfalls in der Fliege ein Zusammenhang zwischen dem TOLL-Protein und der Immunantwort gegen eine Infektion mit dem Schimmelpilz *Aspergillus niger*, festgestellt werden (Lemaitre *et al.*, 1996). TOLL-Homologe in Säugetieren, die TLR (Toll-like Receptors), sind für die Erkennung unterschiedlicher aber sehr spezifischer mikrobieller Strukturen verantwortlich (Medzhitov *et al.*, 1997). Bisher wurden 10 TLR im Menschen und 12 TLR in der Maus entdeckt. TLR können in 5 Subfamilien untergliedert werden, die jeweils nach dem prominentesten Mitglied der Subfamilie benannt sind (TLR2-, TLR3-, TLR4-, TLR5- und TLR9-Subfamilie). Die TLR2 Subfamilie besteht aus TLR1, TLR2, TLR6 und TLR10. Die Mitglieder dieser Subfamilie erkennen verschiedene Lipoproteine, wie z.B. Lipopeptide, Lipoarabinomannan oder Peptidoglycan. Diese Lipoproteine bilden einen wesentlichen Bestandteil der Zellwand Gram-negativer als auch Gram-positiver Bakterien und von Mykobakterien. TLR3 erkennt Virus-generierte doppelsträngige RNA. TLR4 wurde als Bestandteil des Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptors identifiziert (Poltorak *et al.*, 1998). Dabei wird LPS, das als Membranbestandteil Gram-negativer Bakterien vorliegt, an LPS-bindende Proteine (LBP) gebunden. LPS und LPB wiederum können über Assoziation an das membranständige CD14 mit TLR4 interagieren. Der Komplex ist erst nach Bindung von MD2 vollständig (s. Abb. I). TLR5 erkennt das Protein Flagellin, das die Hauptkomponente bakterieller Flagellen bildet. Die Gruppe der TLR9-Rezeptoren, zu der TLR7, TLR8 und TLR9 gehören, erkennt vorwiegend Nukleinsäurestrukturen, es wurden aber auch synthetische Agonisten, wie z.B. Imidazoquinoline, identifiziert. Bakterielle DNA weist im Allgemeinen unmethylierte CpG-Motive (Cytosin-Guanosin Dinukleotidsequenzen flankiert von 5' 2 Purinen und 3' 2 Pyrimidinen) auf, die von TLR9 wahrgenommen werden.

Neben den TLR gibt es intrazelluläre Rezeptoren für mikrobielle Strukturen, unter anderem NOD-1 und -2 die zur Familie der NOD-ähnlichen Rezeptoren (NLR) gehören und die RIG-I-ähnlichen Proteine. NLR detektieren vorwiegend bakterielle Strukturen wohingegen RIG-I-ähnliche Proteine Viren erkennen können.
Die Erkennung von Strukturen durch TLR und NLR führt zur Aktivierung und Differenzierung der Zellen und kann z.B. in Makrophagen die Bildung inflammatorischer Chemokine und Zytokine bewirken. Diese Botenstoffe haben Einfluß auf die Ausbildung einer Entzündung. Zusätzlich führt die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems und letztendlich zur Induktion einer adaptiven Immunantwort.

1.2.2.2 TLR-Signalübertragung

Im Folgenden wird nach TLR-Aktivierung am Beispiel von TLR4 die Signalübertragung dargestellt (Abb. I). TLRs gehören zur IL-1-Rezeptor/TLR Superfamilie, die eine intrazelluläre Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)-Domäne aufweisen. Die TIR-Domäne ist für die intrazelluläre Signalübertragung notwendig. TLR4 bindet über die intrazellulären TIR-Domänen an TIR-Domänen von Adapterproteinen. Das am besten analysierte Adapterprotein ist hierbei MyD88 (Myeloid-Differentiation-Factor-88). Nach TLR4-Liganden-Interaktion treten die TIR-Domänen von TLR4 und MyD88 in Verbindung und zusammen mit dem MyD88-ähnlichen Adapter MAL wird der TLR-Rezeptorkomplex gebildet. MyD88 rekrutiert über seine N-terminale Todesdomäne IRAK-4 (Interleukin-Receptor-Associated-Kinase-4). Es folgt die Phosphorylierung und damit Aktivierung von IRAK-1 und die Bindung an TRAF-6 (TNF-Receptor-Associated-Factor-6). TRAF-6 und IRAK-1 dissoziieren vom TLR-Rezeptorkomplex und binden an TAK1 (TGF-β-Activating-Kinase1) und TAB1 (TAK-Binding-Protein1). Daraufhin wird TAK1 aktiviert und tritt in Wechselwirkung mit dem IKK-Komplex (IκB-Kinase-Komlex), der aus IKK-α, -β und -γ besteht. Dieser wiederum phosphoryliert das inhibierende IκB und setzt damit NFκB, in Makrophagen bestehend aus p50 und c-Rel, frei. NFκB migriert in den Nukleus, bindet an verschiedene Promotoren und induziert die Expression u.a. inflammatorischer Zytokine. Es werden dabei neben anderen die

Zytokine TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12 und IL-18 und die Chemokine CCL-2, CCL-3, und CCL-5 exprimiert (Bonizzi and Karin, 2004;Doyle and O'neill, 2006).

Neben dem zentralen Adapterprotein MyD88 tritt auch TRAM (Toll-Associated-Adaptor-Molecule) über seine TIR-Domäne mit TLR4 in Verbindung. Zusätzlich rekrutiert TRAM TRIF (Toll-Receptor-Associated-IFN-Activator). Dieser TLR-Rezeptorkomplex kann einerseits mit RIP1 (Receptor-Interacting-Protein1) in Wechselwirkung treten und die Aktivierung des IKK-Komplexes und damit, unabhängig von MyD88, die Aktivierung des NFκB-Transkriptionsfaktors auslösen. Andererseits kann eine Verbindung mit dem TBK1-(TANK-Binding-Komplex) IKKε-Komplex entstehen. Dieser Komplex aktiviert den Transkriptionsfaktor IRF-3 (Interferon-Response-Factor-3) und induziert die Expression von IFN-β. Der MyD88-unabhängige Signalweg führt daher zur Expression von inflammatorischen Zytokinen und zur Sekretion von Typ-I-IFN (IFN-α und -β). Es existieren daneben auch inhibitorische Moleküle, die eine MyD88-abhängige oder unabhängige Signalübertragung inhibieren können. Hierbei spielen z.B. MyD88s und die Moleküle IRAK-M und TOLLIP (Toll-Interacting-Protein) eine Rolle.

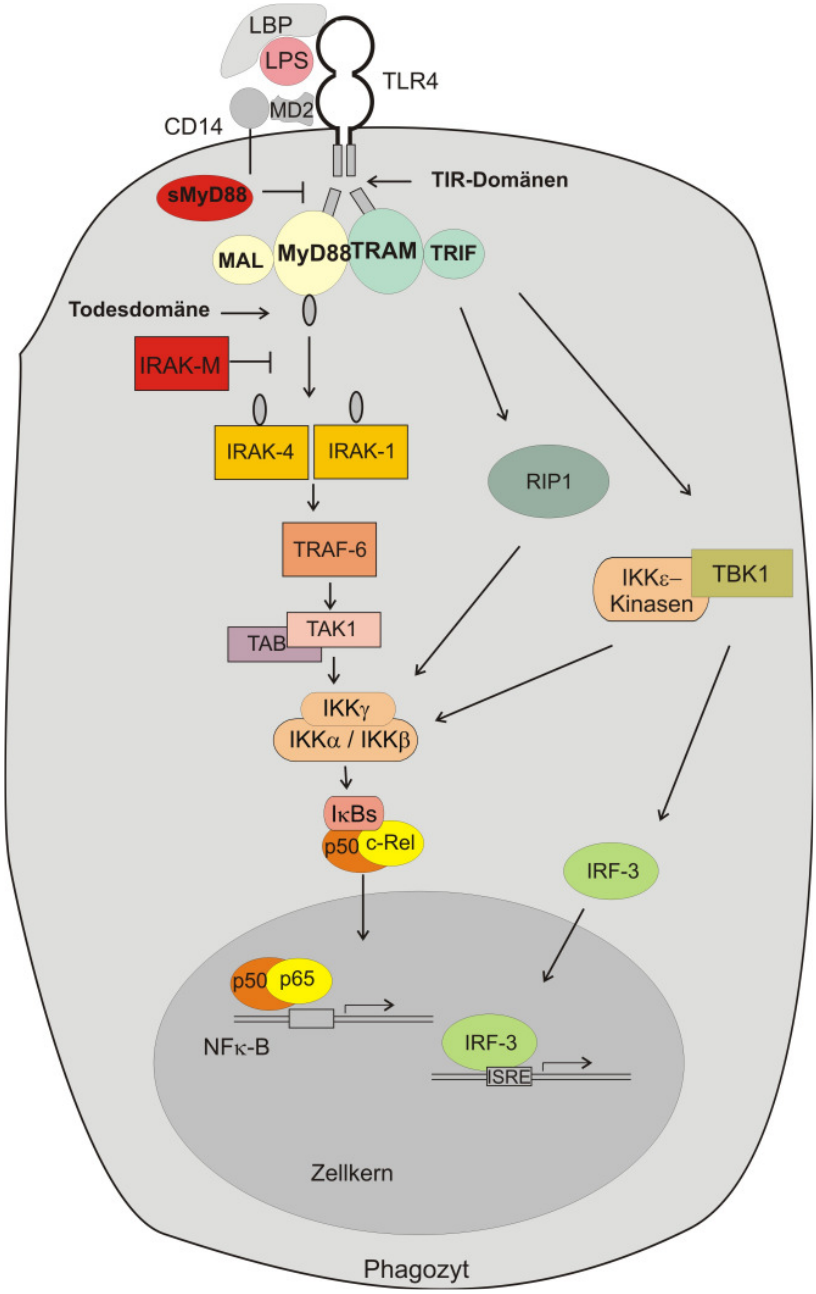

Abb.I. Der TLR4-Signalweg führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und IRF-3. Die Bindung von Liganden an den TLR4 leitet die Bildung eines TLR-Rezeptor-Komplexes ein. Hierbei wird neben einer MyD88-abhängige auch eine MyD88-unabhängige Signaltransduktion induziert. Die Signalübertragung im MyD88-abhängigen Weg löst über IRAK-4, IRAK-1, TRAF-6, TAK1 und TAB eine Kinasekaskade aus, die den IKK-Komplex aktiviert. Der IKK-Komplex phosphoryliert den NFκB-Inhibitor IκB. NFκB kann daraufhin in den Zellkern migrieren, an verschiedene Promotoren binden und die Expression u.a. von inflammatorischer Zytokine und Chemokine induzieren. Der MyD88-unabhängige Signalweg führt zur Aktivierung von IRF-3 und NFκB. Hierfür wird entweder der TBK1-IKKε-Kinase-Komplex und damit IRF-3, oder RIP1 und damit der IKK-Komplex aktiviert. IκB (Inhibitor of NFκB), IKK-Komplex (IκB-Kinase-Komplex), IRAK (Interleukin-Receptor-Associated-Kinase), IRF-3 (Interferon-Response-Factor-3), RIP1 (Receptor-Interacting-Protein), TAB1 (TAK-Binding-Protein1), TAK1 (TGF-β-Activating-Kinase), TBK (TANK-Binding-Komplex), TRAF (TNF-Receptor-Associated-Factor), TRIF (TLR-Associated-IFN-Activator).

1.3 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem zeichnet sich durch seine Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus. Die Zellen der adaptiven Immunabwehr sind hierbei in der Lage spezifische Strukturen von Mikroorganismen zu erkennen und gezielt Abwehrmechanismen zu bilden. Ein Teil der in der Immunantwort generierten Zellen sind ausserdem langlebig und bilden ein immunologisches Gedächtnis. Die Ausbildung von Gedächtnis-B- oder -T-Zellen ermöglicht eine schnelle und hoch-spezifische Immunantwort nach Re-Infektion. Die auf den eingedrungenen Mikroorganismus angepaßte Spezifität der Rezeptoren ermöglicht hierbei eine hohe Effizienz.

Anders als Zellen des angeborenen Immunsystems können Lymphozyten Rezeptoren mit einer sehr großen Zahl an Spezifitäten generieren und daher hoch-spezifisch auf einzelne Keime reagieren. Nachteil dieser Variabilität ist, dass jede B- und T-Zelle im Allgemeinen nur einen Typ von Rezeptor und damit nur eine Spezifität ausbildet. Daraus folgt, dass vor Kontakt mit einem Mikroorganismus der Pool an Zellen, die diesen Mikroorganismus erkennen, relativ begrenzt ist. Erst nach Kontakt mit dem Antigen proliferieren die Lymphozyten. Dadurch entsteht eine große Population an Zellen, die spezifisch für das jeweilige Antigen ist (klonale Selektion). Das bedeutet aber auch, dass eine effektive adaptive Immunantwort verzögert stattfindet.

T- und B-Lymphozyten sind die Zellen des adaptiven Immunsystems. B- und T-Zellen unterscheiden sich grundsätzlich in der Art der Antigene die sie erkennen können. B-Zellen binden hierbei an lösliche Strukturen und Strukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen. T-Zellen hingegen erkennen Peptid-MHC-Klasse-I oder –Klasse-II-Komplexe auf der Oberfläche von APZ.

1.3.1 Antigen-Präsentation

Als Antigen-Präsentation wird die Präsentation von Antigenen bezeichnet, die in Form von Peptidfragmenten an MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche gebunden sind. Nur in dieser Form können Antigenpeptide von T-Zellen erkannt werden. B-Zellen hingegen können mit den membranständigen Antikörpern direkt lösliche Strukturen binden und brauchen im Gegensatz zu T-Zellen kein proteolytische

Antigenprozessierung und Präsentation durch MHC-Klasse-I oder –II-Moleküle. (Germain and Stefanova, 1999;Viret and Janeway, Jr., 1999).

1.3.1.1 MHC-Klasse-II-Moleküle

MHC-Klasse-II-Moleküle bilden ein Heterodimer mit zwei ähnlich großen Proteinuntereinheiten, die Peptidfragmente bis zu einer Größe von 20 Aminosäuren (AS) präsentieren können.

Im ER blockiert ein Protein, das als invariante Kette bezeichnet wird, die peptidbindende Domäne von MHC-Klasse-II-Molekülen, so dass diese für die Beladung mit Peptidfragmenten unzugänglich in der ER-Membran verankert vorliegen (Abb. II). Dieser Block der peptidbindenden Domäne bleibt auch während des Transports der MHC-Klasse-II-Moleküle zu den Endolysosomen erhalten. Im sauren Milieu der Vesikel wird die invariante Kette durch Proteasen abgebaut. Ein kurzes Peptidfragment, das CLIP-Peptid, maskiert jedoch weiterhin die Peptidbindungsspalte. Endozytierte Pathogene werden, wie bereits beschrieben, in den sauren Vesikeln abgebaut, die entstandenen Peptide können erst dann an MHC-Klasse-II-Moleküle binden, wenn CLIP entfernt wurde. Durch die Anlagerung von HLA-DM an die MHC-Klasse-II-Moleküle wird die Freisetzung von CLIP katalysiert. Nach der Bindung von Antigenpeptiden werden die so entstandenen Komplexe an die Zelloberfläche transportiert (Hsing and Rudensky, 2005;Villadangos, 2001). Anders als MHC-Klasse-I-Moleküle werden MHC-Klasse-II-Moleküle nur von wenigen Zelltypen exprimiert. Zu ihnen gehören DCs, B-Zellen, Makrophagen und Epithelzellen des Thymus. Eine verstärkte Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle kann über Interferone gesteuert werden. $CD4^+$ T-Zellen erkennen über ihren T-Zellrezeptor (TZR) MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe.

1.3.1.2 MHC-Klasse-I-Moleküle

MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus heterodimeren Glykoproteinen deren α- und β-Untereinheiten nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die α-Untereinheit besteht aus einer MHC-Klasse-Ia-Kette, die nach Synthese in das Endoplasmatische Retikulum transloziert wird und dort an Calnexin gebunden vorliegt. Für das

vollständige MHC-Klasse-I-Molekül bindet die zweite, kleinere β-Untereinheit (β_2-Mikroglobulin) an die größere Kette, hierbei dissoziiert Calnexin von dem Komplex. Erst dann kann der MHC-Klasse-I-Komplex an Chaperon-Proteine, darunter Calretikulin, binden und über Tapasin an den TAP-Peptidtransporter assoziieren (Abb. II). Durch die Assoziation mit dem TAP-Transporter binden MHC-Klasse-I-Moleküle Antigenfragmente von ca. 9 AS Länge, die aus dem Zytosol stammen. Das sind Peptide von Viren oder von Mikroorganismen, die in das Zytosol einwandern können, wie z. B. *Listeria monozytogenes*, aber auch von körpereigenen Proteinen. Proteine werden im Zytosol synthetisiert und über Proteasomen zu Peptidfragmenten abgebaut. Erst wenn Peptidfragmente über den TAP-Transporter in das ER-Lumen gelangen und dort an MHC-Klasse-I-Moleküle binden, erfolgt die vollständige Faltung des MHC-Klasse-I-Komplexes. Daraufhin verlässt dieser Komplex das ER-Lumen und wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche exportiert (Groothuis *et al.*, 2005). $CD8^+$ T-Zellen erkennen die MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche von APZ über ihre T-Zellrezeptoren und können so auf eventuell fremdes Antigen reagieren (Abb. II). Typ-I-Interferone und Typ-II-Interferon verstärken die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen. Dadurch vergrößert sich die Menge an MHC-Klasse-I-Komplexen auf der Zelloberfläche und somit die Wahrscheinlichkeit, dass eine $CD8^+$ T Zelle ein spezifisches Antigen erkennt.

1.3.2 B-Zellen

B-Zellen stellen neben T-Zellen die Hauptgruppe der Lymphozyten dar. B-Zellen werden im Knochenmark generiert und disseminieren in den Blutkreislauf und lymphoides Gewebe. Die Erkennung von Antigen erfolgt über den B-Zellrezeptor (BZR), einem membrangebundenen Immunglobulin. Immunglobuline bestehen aus einer schweren und einer leichten Kette die über Disulfid-Brücken kovalent miteinander verbunden sind. Sowohl die schwere als auch die leichte Kette setzen sich aus einem konservierten Bereich und einem, für die Bindung des Antigens verantwortlichen, variablen Bereich zusammen. Im Knochenmark wird die Ig-Ketten-Keimbahn-DNA nach somatischer Rekombination zu funktionellen Immunglobulinen umgebaut. Hierbei werden verschiedene V (Variable)- mit

verschiedenen D (Diversity)- und J (Joining)- Bereichen zu einem neuen Gen zusammengefügt.

Die Bindung von Antigenen an den BZR führt zum einen zur Weiterleitung aktivierender Signale in das Zellinnere. Zum anderen sind B-Zellen effizient im Internalisieren von Antigenen und präsentieren diese wie DCs über Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexe auf der Zelloberfläche. Antigenspezifische $CD4^+$ T-Zellen erkennen die präsentierten Peptide und unterstützen die anschließende B-Zelldifferenzierung. Das erfolgt nach Interaktion des Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexes mit dem TZR und zusätzlicher Co-stimulation durch Bindung von CD40 durch den CD40-Liganden der $CD4^+$ T-Zellen. Zusätzlich sezernieren T-Zellen Zytokine, vor allem IL-4, IL-5 und IL-6, die die B-Zelldifferenzierung unterstützen.

In peripheren lymphatischen Organen findet, unterstützt von aktivierten T-Zellen, eine weitere Reifung der B-Zellen statt. Dieser Vorgang wird als somatische Hypermutation bezeichnet und beinhaltet die Einführung von Punktmutationen in die variablen Bereiche der Ig-Ketten. B-Zellen mit einer erhöhten Affinität zeigen verstärkte Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen. (Jacobs and Bross, 2001;Oltz, 2001;Rajewsky, 1996). Obwohl B-Zellen auch ohne T-Zellhilfe durch Antigene aktiviert werden können, braucht es für die somatische Hypermutation und den Isotypen-Wechsel der Antikörper den zusätzlichen T-Zellstimulus.

Die konstante Region der schweren Immunglobulinkette bestimmt den Isotyp. Im Verlauf einer Infektion kann ein Wechsel des Isotyps erfolgen, der ebenfalls durch somatische Rekombination stattfindet. Es gibt 5 Hauptisotypen: IgM, IgD, IgG, IgE und IgA, wobei IgG den häufigsten Ig-Subtyp im Blutplasma ausmacht und in der Maus zusätzlich noch in IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 unterteilt werden kann. Im Menschen findet hingegen eine Unterteilung in IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 statt. Der Isotypen-Wechsel erfolgt ebenfalls durch T-Zellvermittelte Signale wie IFN-γ oder IL-4. Wobei IFN-γ den Wechsel zu IgG2a und 2b begünstigt und IL-4 zu IgG1 und IgE.

In der Immunabwehr üben Antikörper unterschiedliche Funktionen aus. Neben der Komplementaktivierung und Neutralisierung spielt die Opsonierung von größeren Mikroorganismen und die dadurch erleichterte Aufnahme durch Phagozyten, eine wichtige Rolle. Zusätzlich kann die Zerstörung von antikörperbeschichteten Zellen durch NK Zellen induziert werden. Hierbei bindet der an der schweren Kette

gelegene Fc-Bereich der IgGs den Fcγ–Rezeptor-III (CD16) auf der Oberfläche von NK-Zellen. Die nach Quervernetzung der Antikörper aktivierten NK-Zellen schütten zielgerichtet den proteolytischen Inhalt ihrer Granula aus und führen so zur Zerstörung der Zielzelle. Die humorale Immunabwehr kann durch verschiedene Zytokine unterschiedlich gesteuert werden, aber auch Pathogenassozierte Mitogene wie zum Beispiel LPS nehmen Einfluss auf die B-Zellaktivierung.

1.3.3 T-Zellen

T-Zellen bilden die zweite große Gruppe der Lymphozyten und bestehen aus $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, die im Thymus den Status als voll-funktionsfähige T-Zellen erhalten. Wie B-Zellen besitzen auch T-Zellen Oberflächenrezeptoren, hier T-Zellrezeptoren (TZR), die der Wahrnehmung von Peptid-MHC-Komplexe dienen. Der T-Zellrezeptor von konventionellen T-Zellen ist ein Heterodimer bestehend aus einer α- und einer β-Kette. In einer T-Zellsubpopulation können diese Ketten aber auch durch eine γ- und einer δ-Kette ersetzt werden. $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen werden über unterschiedliche MHC-Moleküle aktiviert. Die primäre Aktivierung der naiven T-Zellen findet in Lymphknoten oder in der Milz statt und führt zur Differenzierung und Proliferation der T-Zellen.

Die Rezeptoren der T-Zellen durchlaufen, wie die BZR, eine somatische Rekombination. Dadurch werden auch hier hochvariable TZR-Untereinheiten erzeugt, die zu einem beinahe unbegrenzten Repertoire an Bindungsmöglichkeiten führen. TZR können nicht sekretiert werden und stellen somit, im Gegensatz zu Antikörpern, keinen Bestandteil der humoralen Immunantwort dar.

Die T-Zellantwort wird durch die Interaktion des TZR/CD3-Komplexes naiver T-Zellen mit dem MHC-Komplex von APZ wie z.B. DCs. hervorgerufen. In Gegenwart von co-stimulierenden Signalen, wie z.B. CD28, führt diese Interaktion zur Aktivierung und klonalen Expansion der T-Zellen. Es folgt die Reifung der T-Zellen in Effektor-T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen. Gedächtnis-T-Zellen generieren nach einer Sekundär-Infektion mit dem gleichen Pathogen sofort adäquate Effektormechanismen, die unabhängig von co-stimulierenden Signalen erfolgen kann.

1.3.3.1 CD8$^+$ T-Zellen

Für die Eliminierung intrazellulärer Pathogene wird neben der T_H1-Antwort vor allem die MHC-Klasse-I-restringierte, zelluläre CD8$^+$ T-Zellantwort gebraucht (Haring *et al.*, 2006;Watts and Powis, 1999).

Naive CD8$^+$ T-Zellen verfügen nicht über lytische Mechanismen und sezernieren nur ein eingeschränktes Zytokinprofil. Nach Erkennen von Antigenpeptiden im MHC-Klasse-I-Komplex auf professionellen APZ, reifen Lymphozyten zu funktionellen, zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) heran. Zusätzlich ist die Co-Stimulation der T-Lymphozyten durch Bindung von CD28 auf der T-Zelloberfläche mit B7 auf der Oberfläche professioneller APZ nötig. CTL zeigen verschiedene zytolytische Mechanismen und sezernieren IFN-γ und TNF-α. Reife CTL können unabhängig von Co-Signalen aktiviert werden.

Die Differenzierung von CD8$^+$ T-Zellen wird von CD4$^+$-Helferzellen unterstützt. Hierbei erkennen CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen MHC-Klasse-II und Klasse-I-präsentierte Antigenpeptide auf derselben Antigen-präsentierenden Zelle. CD4$^+$ T-Zellen sezernieren zum einen IL-2 für die Aktivierung der CD8$^+$ T-Zellen und interagieren zum anderen mit DCs. Die wechselseitige Aktivierung zwischen DCs und CD4$^+$ T-Zellen hat zur Folge, dass DCs co-stimulierende Signale für die Aktivierung der CD8$^+$ T-Zellen bereitstellen. Co-stimulierende Signale beinhalten u.a. die Bindung von B7, CD40L und 4-IBBL auf der Oberfläche von professionellen DCs an CD28, CD40 und 4-IBB auf der Oberfläche der CD8$^+$ T-Zellen. In starken Entzündungsreaktionen können Zytokine die T-Zellhilfe teilweise ersetzen.

Aktivierte CD8$^+$ T-Zellen / CTL wandern durch das Gewebe und binden über das Intergin LFA-1 auf ihrer Oberfläche an die zur Immunglobulin-Superfamilie gehörenden ICAM-1 oder ICAM-2 anderer Zellen. Erkennt eine zytotoxische T-Zelle ihr spezifisches Peptid im MHC-Klasse-I-Kontext, wird die Bindung an die Zielzelle weiter stabilisiert und es folgt die Bildung eines supramolekularen Adhäsionskomplexes (SMAC). Die Polarisierung der zytotoxischen CD8$^+$ T-Zellen beinhaltet das Ausrichten auf die Zielzelle und die damit verbundene Umorganisation des Zytoskeletts. Die Ausschüttung der Effektormoleküle erfolgt somit sehr gerichtet. Zu den Effektormolekülen gehören neben Perforin auch Granzym und im Menschen und im Schwein zusätzlich das antimikrobielle Protein Granulysin. Die Zerstörung der Zielzelle kann durch zwei unterschiedliche Prozesse

durchgeführt werden. (Lord *et al.*, 2003;Podack, 1995;Young *et al.*, 1989). Zum einen können die in den ausgeschütteten lytischen Granula vorhandenen Zytotoxine die Zellmembran der Zielzelle durchqueren und umgehend zum Zelltod führen. So kann Perforin in die Zellmembran eindringen, die Membranintegrität aufheben und die Zelle dadurch lysieren. Diese Form der Zelllyse wird durch eine Reihe von co-sekretierten Granzymen noch verstärkt. Die andere Form der Zellzerstörung erfolgt über die Interaktion von Fas (CD95) mit Fas-Ligand auf der Zelloberfläche der Zielzelle. Fas gehört zur TNF-Rezeptor-Superfamilie (Orlinick *et al.*, 1999) und seine Bindung an den Fas-Liganden induziert den programmierten Zelltod der Zielzelle (Apoptose). Nachdem die Zielzellen zerstört wurden, sind die intrazellulären Pathogenen dem humoralen aber auch weiteren zellulären Bestandteilen des Immunsystems ausgeliefert. $CD8^+$ T-Zellen produzieren nach spezifischer Stimulation zusätzlich stark inflammatorische Zytokine wie z.B. TNF-α und IFN-γ (Haring *et al.*, 2006;Mosmann *et al.*, 1997). IFN-γ kann die virale Replikation in infizierten Zellen hemmen und gleichzeitig die MHC-Klasse-I-Produktion verstärken. Das führt zu einer größeren Wahrscheinlichkeit, dass die infizierten Zellen von weiteren $CD8^+$ T-Zellen erkannt und zerstört werden können. Zusätzlich rekrutiert und aktiviert IFN–γ zusammen mit TNF–α Makrophagen. TNF-α kann zudem über Bindung an den TNF-Rezeptor Apoptose in den infizierter Zellen auslösen.

1.3.3.2 $CD4^+$ T-Zellen

T_H1- und T_H2-Zellen

$CD4^+$ T-Zellen können aufgrund ihres Zytokinprofils und aufgrund ihrer immunologischen Funktion unterschieden werden. Wichtige Populationen sind hierbei T_H1-Zellen, T_H2-Zellen, regulatorische T-Zellen und T_H17-Zellen (Mosmann and Coffman, 1989;Stockinger *et al.*, 2006).

T_H2-Zellen können IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 sezernieren. Diese Zytokine unterstützen die B-Zelldifferenzierung und die humorale Immunantwort (Jankovic *et al.*, 2001;Mosmann and Coffman, 1989). Eine wichtige Funktion der T_H2-Immunantwort ist die Regulation der Immunantwort gegen Helminthen. Darüber

hinaus ist diese T-Zellpopulation für das Entstehen vieler allergischer Reaktionen mitverantwortlich.

T_H1-Zellen sezernieren vor allem die inflammatorischen Zytokine IFN-γ, TNF-α. und darüber hinaus auch IL-2. Folglich sind T_H1-Zellen effektive Aktivatoren der zellulären Immunantwort. Makrophagen werden z.B. vollständig aktiviert und erlangen mikrobizide Eigenschaften. Auch andere Zellen werden aktiviert, und zur verstärkten Präsentation von MHC-I bzw. II angeregt.

Eine besondere Rolle in der Entwicklung einer T-Helfer-Immunantwort spielt das Zytokin IL-12. IL-12 wird wie TNF-α und IFN-α und -β früh in der Immunantwort gebildet und führt neben der Aktivierung von NK-Zellen zur Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H1-Zellen.

Regulatorische T-Zellen

Neben den bereits beschriebenen $CD4^+$ T-Zellsubtypen gibt es zusätzlich die Gruppe der regulatorischen T-Zellen. Dieser T-Zellsubtyp hat die Fähigkeit verschiedene Aspekte wie z.B. die Stärke der erworbenen als auch der angeborenen Immunantwort zu hemmen. Natürlich vorkommende $CD25^+$ $CD4^+$ regulatorische T-Zellen sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 gekennzeichnet, der als Kontrollmolekül in ihrer Entstehung eine Rolle spielt aber auch der Funktion dieser Zellen dient (Sakaguchi *et al.*, 2006). Der Mechanismus der Hemmung einer Immunantwort ist nicht vollständig geklärt. *In-vivo* scheint mehr als nur ein Mechanismus für die suppressive Wirkung der regulatorischen T-Zellen verantwortlich zu sein. Neben einer direkten Zell-Zell-Interaktion und der CTLA-4-vermittelten Inhibierung, wird auch die Wirkung immunsuppressiver Zytokine wie TGF-β, und IL-10 aber auch Perforin- und Granzym-vermittelte Zytotoxizität, als Ursache der Suppression diskutiert.

T_H17-Zellen

Vor kurzem wurde zusätzlich zu den bisher bekannten T-Helferzellen eine weitere T-Helferpopulation beschrieben, die T_H17-Zellen (Aggarwal *et al.*, 2003;Harrington *et al.*, 2005;Langrish *et al.*, 2005). $CD4^+$ T-Zellen, exprimieren nach Antigen-Erkennung und durch regulatorische T-Zellen vermittelten TGF-β-Stimulus, verstärkt den Rezeptor für IL-23. Nach IL-23-Bindung an seinen Rezeptor wird in

diesen $CD4^+$ T-Zellen die Bindungsbereitschaft für IL-1 und IL-18 erhöht. Es entstehen IL-17- produzierende T_H17-Zellen, die zusätzlich noch IL-6 sezernieren können. T_H17-Zellen wirken als Effektor-T-Zellen in der Immunantwort gegen Pathogenen mit, und verstärken T_H1 oder T_H2 Zellantworten. IL-17 induziert in Epithelzellen und Makrophagen eine Anzahl an inflammatorischen Mediatoren, darunter verschiedene Zytokine, Metalloproteinasen und Chemokine die insbesondere Neutrophile rekrutieren (Kolls and Linden, 2004).

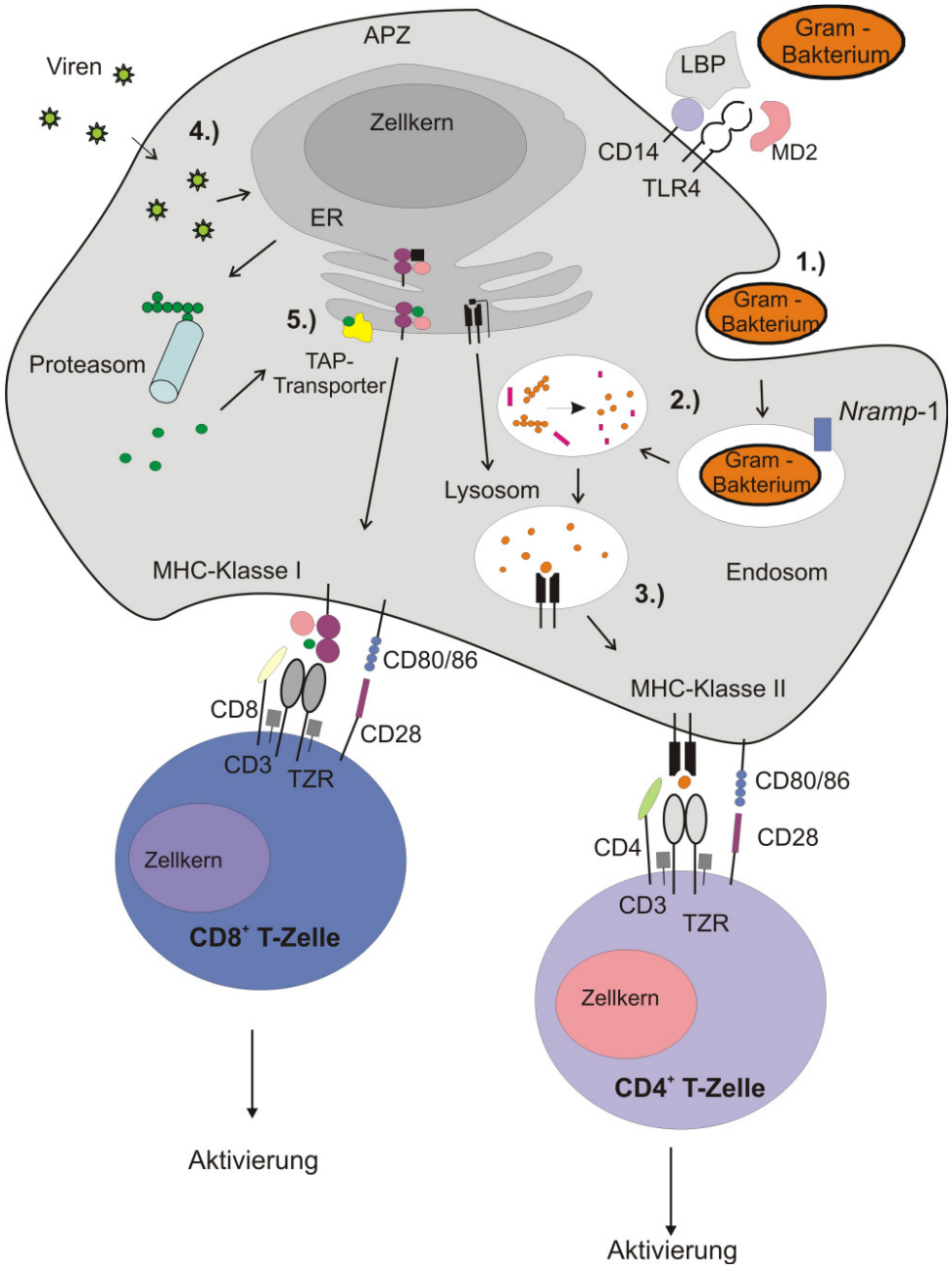

Abb.II: Antigen-Präsentation und T-Zellaktivierung. Nach Aufnahme von Mikroorganismen (1) findet der proteolytische Abbau der Mikroorganismen u.a. im späten Endosom und im Phagolysosom statt (2 + 3). Nach Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle mit Antigenpeptiden (3), wird der so entstandene Komplex an die Zelloberfläche transportiert. Daraufhin erfolgt die Erkennung der Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexe über den TZR der $CD4^+$ T-Zellen. Die $CD4^+$ T-Zellaktivierung wird zusätzlich über co-stimulatorische Moleküle unterstützt. Nach Infektion erfolgt die Replikation von Viren im Zytoplasma der Wirtszelle. Durch das Proteasom werden Proteine zu Peptiden abgebaut. Die Peptide werden über den TAP-Transporter in das ER-Lumen transloziert. MHC-Klasse-I-Moleküle werden dann mit mikrobiellen Peptiden beladen. Es folgte der Transport der Peptid-MHC-Klasse-I-Komplexe an die Zelloberfläche. $CD8^+$ T-Zellen erkennen Peptide im MHC-Klasse-I-Kontext und werden aktiviert. Auch hier erfolgt eine zusätzliche Co-Stimulation über die Bindung von B7-Molekülen der APZ an CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen.

1.4 Die *Salmonellen*-Infektion

1.4.1 Salmonella eneterica-Infektionen

Salmonellen gehören zur Familie der Enterobacteriaceae und sind fakultativ intrazelluläre, Gram-negative Bakterien. Die ubiquitär vorkommenden *Salmonellen* können eine Vielzahl von Erkrankungen hervorrufen. Nach dem Kauffmann-White-Schema, dass die Einteilung der Serotypen aufgrund unterschiedlicher O- und H-Antigenen einteilt, gibt es weltweit mehr als 2500 *Salmonellen*-Serovare. Für den Menschen sind sowohl *Salmonella enterica subsp. enterica* Serovar Enteritidis oder Typhimurium, kurz *S. enteritidis* und *S. typhimurium* als auch *Salmonella enterica subsp. enterica* Serovar Typhus, kurz *S. typhi* Pathogen. *S. typhi* kommt beim Tier nicht vor, der Mensch stellt hier das alleinige Wirtsspektrum dar.

Die Infektion mit *S. typhi* führt zu schweren enterischen Fiebererkrankungen, die etwa 1-3 Wochen nach Infektion mit einem stufenweisen Temperaturanstieg auf 39-40°C beginnen. Beim Typhus abdominalis sind Darmblutungen und -perforationen und starker Durchfall von besonderer Bedeutung. Die Erkrankung verläuft in verschiedenen Stadien und die Letalität beträgt bei Nichtbehandlung 15 Prozent. Weltweit rechnet die Weltgesundheitsorganisation (WHO) mit jährlich mehr als 16 Millionen Typhus-Erkrankungen, davon endet etwa eine halbe Million tödlich. Nach Abklingen der Infektion entwickeln sich ca. 3 Prozent aller *Salmonellen*-infizierten Personen zu Dauerausscheidern, wobei die Pathogene in der Gallenblase persistieren (Monack *et al.*, 2004). Der schwere Verlauf der *S. typhi*-Erkrankungen wird durch spezielle Virulenzfaktoren und Kapselproteine verursacht. Dazu gehört neben dem LPS-Lipid-A-Fragment auch das Vi-Antigen. Sezernierte Proteine, darunter auch InvA und SipA, stimulieren nicht-phagozytierende Zellen zur Aufnahme der Pathogene und ermöglichen damit eine intrazelluläre Replikation der *Salmonellen* (Galan and Curtiss, III, 1991;Stebbins and Galan, 2001).

Im Gegensatz dazu verursacht die Infektion mit *S. enteritidis* oder *S. typhimurium* im Menschen meist spontan ausheilende Gastroenteritiden, die in der Regel nicht antibiotisch behandelt werden müssen. Bei Risikogruppen, wie Säuglingen, Kleinkindern, alten Menschen, HIV-Patienten und immungeschwächten Patienten kann eine Infektion mit diesen Erregern jedoch schwere Erkrankungen hervorrufen.

1.4.2 *Salmonella typhimurium* Infektion im Mausmodell

Die Infektion mit *Salmonella typhimurium* führt in der Maus zu einer Typhus-ähnlichen Erkrankung und wird daher als anerkanntes Typhus-Versuchsmodell verwendet (Mäkelä and Hormaeche, 1997). Nach oraler Aufnahme überleben die *Salmonellen* das stark saure Milieu des Magens und überqueren im Darm das Epithelgewebe vermutlich über spezialisierte Zellen, den sogenannten M-Zellen. Von dort gelangen die Mikroorganismen über die Peyerschen Plaques in die Mesenterischen Lymphknoten und disseminieren in Milz und Leber, die die Hauptreplikationsorte dieses Pathogens darstellen. *S. typhimurium* vermehrt sich zumeist in Makrophagen aber beispielsweise auch in den nicht-phagozytierenden Hepatozyten (Conlan and North, 1992;Fields *et al.*, 1986). Um auch in nicht-phagozytierende Zellen eindringen zu können, ist die Expression des Typ-III-Sekretionsapparates (TTSS) und der Effektorproteine, die zusammen auf dem *Salmonellen*-Pathogenitätsinsel-(SPI)-1-Genabschnitt kodiert vorliegen, essentiell (Patel and Galan, 2005). Nach Injektion unterschiedlicher Effektorproteine (u.a. SipA und SopE) in das Zytosol der Zielzellen findet eine Modulation des Zytoskeletts statt. Das ermöglicht die darauffolgende Aufnahme der *Salmonellen* in die Zellen. In der so entstandenen SCV (Salmonella Containing Vacuole) wird die Expression des TTSS des SPI-2-Genabschnittes eingeleitet. Die auf diesem Gensegment kodierten Proteine sind für die Übermittlung weiterer Effektorproteine über die SCV-Membran in das Zytosol der Wirtszelle notwendig. Diese Mechanismen stehen virulenten und auch *aro*A$^-$ *S. typhimurium* zur Verfügung und führen zur systemischen Infektion des Wirtes. Die Bedeutung einzelner Komponenten des SPI-2 Genabschnittes konnte in Studien mit SseJ und SifA-*Salmonellen*-Mutanten gezeigt werden (Freeman *et al.*, 2003;Miao *et al.*, 1999;Stein *et al.*, 1996). In der frühen Phase der Immunantwort kommt es zur Aktivierung von Phagozyten und zur Sekretion inflammatorischer Zytokine, vor allem IFN-γ, TNF-α, IL-1 und Phagozyten-rekrutierender Chemokine. Zusätzlich können Makrophagen sowohl Stickstoff-Intermediate als auch Sauerstoffradikale bilden, die bakterizid wirken. Neben Makrophagen spielen insbesondere Neutrophile eine wichtige Rolle in der frühen Immunantwort nach *S. typhimurium*-Infektion (Seiler *et al.*, 2000).

Verschiedene Mausstämme weisen eine unterschiedliche Anfälligkeit gegenüber der Infektion mit *S. typhimurium* auf. Das ist in erster Linie durch die Expression des

Nramp-1-Proteins begründet. Dieses Protein dient als Protonen-divalente Kationen-Antiporter dem Ionentransport an der Phagolysosomen-Membran von professionell phagozytierenden Zellen (Abb.II). *Nramp*-1 ist somit in die Kontrolle der bakteriellen Vermehrung in der frühen Phase der Infektion involviert. Viele Labor-Mausstämme, darunter auch der C57BL/6-Laborstamm, tragen eine mutierte Version des *Nramp*-1 Gens (Nramp-1^s) und synthetisieren kein funktionelles *Nramp*-1 Protein. Diese Mäuse zeigen nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* eine erhöhte Anfälligkeit, die sich durch eine unkontrollierte Replikation der *Salmonellen* äußert. Mäuse, die kein funktionelles *Nramp*-1 exprimieren sterben innerhalb weniger Tage nach Infektion mit virulenten *Salmonellen*.

1.4.3 T-Zellantwort nach *Salmonellen*-Infektion

Zellen des angeborenen Immunsystems können die Vermehrung der *Salmonellen* unterbinden, jedoch ist für die vollständige Beseitigung der Pathogene die Beteiligung der erworbenen Immunantwort notwendig.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass $CD4^+$ T-Zellen die entscheidende Zellpopulation bei der Eliminierung von *Salmonellen* darstellen. Darüber hinaus sind auch $CD8^+$ T-Zellen an einer erfolgreichen Immunantwort nach *Salmonellen*-Infektion beteiligt (Hess *et al.*, 1996;Mittrucker *et al.*, 1999;Mittrucker and Kaufmann, 2000;Nauciel, 1990;Sinha *et al.*, 1997).

Die von T_H1-Zellen sezernierten Zytokine TNF-α und IFN-γ führen zu einer starken Aktivierung bakterizider Mechanismen in professionellen Phagozyten, insbesondere in Makrophagen. Zusätzlich dazu ist eine Beteiligung der $CD4^+$ T-Zellen an der Ausbildung der $CD8^+$ T-Zellantwort nach *Salmonellen* Infektion notwendig. $CD4^+$ T-Zellen sind zudem an der Generierung einer T Zell-abhängigen Antikörperantwort (IgG2a, IgG2b und IgG1) nach *Salmonellen* Infektion beteiligt (Mittrucker *et al.*, 1999). Die spezifische Immunantwort führt zur Klärung der *Salmonellen* Infektion und zur Generierung eines immunologischen Gedächtnisses, bestehend aus Gedächtnis-B- und Gedächtnis-T-Zellen (Hess *et al.*, 1996;Mastroeni *et al.*, 1992;Nauciel, 1990).

Die Infektion mit *S. typhimurium* gehört zu den wenigen Infektionen mit fakultativ intrazellulären Bakterien, in denen neben der T-Zellantwort die Beteiligung von B-

Zellen und Antikörpern an der Immunantwort von Bedeutung ist (Mittrucker *et al.*, 2000b). Im Darmgewebe spielt die Sekretion von IgA eine besondere Rolle in der Abwehr der *Salmonellen* Infektion. Die systemische Produktion von Immunglobulinen kann neben der Neutralisation auch zur Opsonisierung der *Salmonellen* führen.

Die Infektion von *Nramp*-1^s Mäusen mit virulenten *S. typhimurium* ermöglicht die Untersuchung von *Salmonellen*-Virulenzfaktoren und die Wirtsimmunantwort in der frühen, akuten Infektion. Um die die erworbene Immunantwort nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* untersuchen zu können, werden Mäuse mit funktionellem Nramp verwendet (*Nramp*-1^r) (Mittrucker *et al.*, 2002).

Viele "knockout"-Mausstämme stehen leider nur auf dem *Nramp*-1^s C57BL/6 Hintergrund zur Verfügung. Die Verwendung von attenuierten *Salmonellen*-Stämmen erlaubt aber die Analyse der Immunantwort in diesen Mäusen. *Aro*A$^-$ *Salmonellen*-Stämme sind auf die Synthese bestimmter aromatischer Aminosäuren durch die Wirtszelle angewiesen. Das wirkt sich als limitierender Faktor auf die Replikation der *Salmonellen* aus, so dass auch *Nramp*-1^s-Tiere die Infektion überleben und die Bakterien klären können. Die Infektion von *Nramp*-1^s Mäusen mit attenuierten *Salmonellen* ermöglicht es daher die adaptive Immunantwort auch in diesen Tieren zu untersuchen.

In verschiednen Infektionsmodellen konnte gezeigt werden, dass eine starke Entzündung eine Aktivierung von T-Zellen unabhängig von ihrer Spezifität hervorruft (Jiang *et al.*, 2003). Ein Großteil der so aktivierten T-Zellen wird, wenn kein TZR-spezifischer Stimulus folgt, apoptotisch (Jiang *et al.*, 2003). Gram-negativer Bakterien sezernieren LPS zur Modulation der Immunantwort. LPS wird hierbei eine wichtige Rolle in der TZR-unspezifischen Aktivierung zugewiesen (Tough *et al.*, 1997). Es ist zurzeit noch unklar welche Auswirkung die durch Infektion mit *S. typhimurium* hervorgerufene, starke Entzündung auf die naive T-Zellpopulation hat. Bisher wurde nicht geklärt wie sich die Entzündung auf die Funktion der T-Zellen, insbesondere der Fähigkeit zur Aktivierung Differenzierung, auswirkt.

2 Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung

Die Infektion mit *S. typhimurium* induziert in Mäusen eine schwere Entzündung, die in Abhängigkeit des verwendeten *Salmonellen*-Stamms der Infektionsdosis und dem infizierten Mausstamm zum Tod der Mäuse führen kann. Für die Klärung der *Salmonellen* ist neben dem angeborenen Immunsystem das erworbene Immunsystem essentiell.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Auswirkung der *S. typhimurium*-Infektion auf die Ausbildung der erworbenen Immunantwort im Mausmodel.

Dafür sollte zum einen der Einfluß von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems auf die Ausbildung der erworbenen Immunantwort nach *Salmonellen*-Infektion untersucht werden. Hierfür wurden C57BL/6-Mäuse, TLR2-, TLR4-, TLR 2+4- und MyD88-defiziente Mäuse mit einem attenuierten *S. typhimurium*-Stamm infiziert. Die Ausbildung der T_H1-Immunantwort, der IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellantwort und die Fähigkeit dieser Mäuse zur Induktion einer *Salmonellen*-spezifischen Antikörperantwort wurde untersucht. Zusätzlich sollte ein Chemokin- und Zytokinprofil TLR2+4- und MyD88-defizienter Mäuse im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen nach *Salmonellen*-Infektion erstellt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Auswirkung der nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* hervorgerufenen Entzündung auf die T-Zellantwort analysiert werden. Es sollte geklärt werden, wie sich die Infektion von hochsuszeptiblen Mäusen mit virulenten *Salmonellen* auf die Aktivierung naiver T-Zellen auswirkt. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob und wie die Funktion der T-Zellen hinsichtlich ihrer Differenzierung beeinflusst wird Hierfür wurde ein murines Transfersystem verwendet, in dem T-Zellen bekannter Spezifität adoptiv in Rezipienten übertragen wurden. Dieser Versuchsaufbau erlaubte einerseits die TZR-unabhängige T-Zellaktivierung zu .untersuchen. Andererseits durch TZR-spezifische Restimulation die Auswirkung der Entzündung auf die Differenzierung der T-Zellen zu analysieren.

3 Material

Adressen sowie Kontaktinformationen sind unter 8: Zulieferer-Verzeichnis aufgelistet.

3.1 Geräte und Materialien

Adhäsions-Objektträger, Histobond 75 x 25 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
BD- Microtainer™ SST (Blutabnahme Röhrchen)	BD Pharmingen
Brutschrank:	Binder
Durchflusszytometer FACSCanto®	Becton Dickinson
Einmal-Spritzen und –Kanülen:	B.Braun Melsungen AG
ELISA-Reader Spectra Max 250	Molecular Devices GmbH
Kryostat Microm HM500om	Carl Zeiss AG
Laminar-Air HB2448-Werkbank :	Heraeus Instrumente
MACS-Säulen, -Magneten, -Ständer:	Miltenyi Biotech GmbH
Mikroskop DM LS:	Leica
Neubauer Zählkammer:	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
ABI Prism 7900 Sequence Detection System / PCR Thermozykler	Applied Biosystems
Rundsieb Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG
Thermomixer compact	Eppendorf
Tissue-Tek® Cryomold®, intermediate	Sakura Finetek Europe B.V.
Ultra Turrax T8 Gewebe Zerkleiner	IKA Labortechnik
Zellkulturplatten, 96well, Immuno Maxi-Sorp	Nunc über WCP, Berlin
Zellsieb (40µm Nylon)	BD Falcon™ über WCP
Zentrifuge Heraeus Megafuge 2.0 R	Heraeus
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf

3.2 Reagenzien

5-,6- Carboxyfluorescein-diacetat-Succinimidylester (CFSE)	Molecular Probes
7-AAD	BD Pharmingen
Aceton	Merck KgaA
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Merck KgaA
Annexin-V (FITC-gekoppelt)	BD Pharmingen
Bacto-Trypton	
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Brefeldin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dulbeccco's Modified Eagle Medium (D-MEM)	Invitrogen GmbH
Diethanolamin	Merck KgaA
Difco™ MacConkey Agar	BD Pharmingen
Ethanol	Merck KgaA
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Fötales Kälberserum (FCS), hitze-inaktiviert für 30 min bei 60 °C	Biochrom AG
Glyzerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hämatoxylin	Merck KgaA
Heparin	B.Braun Melsungen AG
Hühnereiweißalbumin (OVA), Grad V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ionomycin Calcium Salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumhydrogencarbonat ($KHCO_3$)	Merck KgaA
L-Glutamin (200mM)	Invitrogen GmbH
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck KgaA
MicroBeads (anti-CD8α)	Miltenyi Biotech
Natrium-Pyruvat	Biochrom
Natrium-Azid (NaN3)	Merck KgaA
OVA-Peptid ($OVA_{257-264}$) (Sequenz: SIINFEKL)	Jerini AG

Paraformaldehyd (PFA)	Merck KgaA
PBS Dulbecco w/o Ca^{2+}, Mg^{2+}	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phosphatase Substrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RPMI 1640	Invitrogen GmbH
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Streptavidin	Molecular Probes
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V.
Trizol Reagenz	Gibco
Trypan-Blau (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tryptic Soy Broth	BD Difco
Tween20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

3.3 Software Programme

Diva Software	Becton Dickinson
FCS-Express-V2 und -V3	De Novo Software
SDS2.2 Software	Applied Biosystems
Graph Pad Prism-4	GraphPad Software
CorelDraw-11	Corel Corporation

3.4 Medien und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit *Millipore* destilliertem Wasser angesetzt. Die Lösungen wurden durch Autoklavieren bei 121°C für 25 Minuten sterilisiert, die mit (*) gekennzeichneten Lösungen mittels Filtern durch 0,2µm Membran-Filter sterilisiert.

3.4.1 Puffer / Lösungen und Medien für Zellaufbereitung

Erythrozyten-Lyse-Puffer: 155 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 0,1 mM EDTA

Fixierungslösung: PBS, 4% PFA (w/v)

DMEM Komplettmedium:*	D-MEM, 10% (v/v) FCS, 2% (v/v) Natrium-Pyruvat, 2% (v/v) L-Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1% (v/v) β-Mercaptoethanol
Permeabilisierungs Puffer:*	PBS, 0,5% BSA (w/v), 0,5 % Saponin (w/v)
MACS-Puffer:*	PBS, 0,5% BSA (w/v), 2 mM EDTA
Annexin-V Bindungs-Puffer:*	PBS, 10 mM Hepes (pH 7.4) 140 mM NaCl 2.5 mM $CaCl_2$

3.4.2 Lösungen für ELISA

Medium:	RPMI 1640, 10%FCS (v/v)
Waschpuffer:	PBS, 0.1% BSA (w/v), 0.05 % Tween20 (v/v)
Blockpuffer:	PBS, 0,1% BSA (w/v)
Substratpuffer:	97 mM Diethanolamin, 0,8g/l $MgCl_2$ x $6H_20$, 0,2g/l NaN_3^+, 2 Tabletten Phosphatase Substrat
Stopplösung:	PBS, 0,5 M EDTA, pH 8,0

3.4.3 Medium für Bakterienkultur

Luria Bertani (LB) Medium:	1% (w/v) Bacto-Trypton, 0.5% (w/v) Hefextrakt 85.5 mM NaCl, pH 7.5
LB amp Medium:	1% (w/v) Bacto-Trypton, 0.5% (w/v) Hefextrakt 85.5 mM NaCl, Ampicillin (50µg/ml) pH 7.5
Tryptic Soy Broth (TSB):	3% (w/v) Tryptic Soy Broth

3.5 Antikörper

Übersicht über die verwendeten, monoklonalen Antikörper. Alle mit einem Stern (*) markierten monoklonalen Antikörper wurden aus Hybridoma-Überständen mit Hilfe von Protein-G Sepharose aufgereinigt. Die für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC, PE, Cy-5 oder PE-Cy7 markiert. Die mit einem Nummernzeichen (#) versehenen Antikörper dienten

als Isotype Kontrolle. Durchflusszytometrie wurde mit DZ, *In-vitro*-Restimulation wurde mit IVR und Block unspezifischer Ak-Bindungen, wurde mit B abgekürzt. Der für die Apoptose-Induktion verwendetet Antikörper wurde mit A abgekürzt.

Tabelle I: Für Zellisolation, ELISA, bzw. in der Durchflusszytometrie verwendete oder im Apoptose-Assay verwendete Antikörper

Spezifität	Klon	Anwendung	Herkunft
CD3	145-2C11	IVR	MPI*
CD4	GK 1.5	DZ	BD Pharmingen
CD8α	YTS169	DZ	MPI*
CD16/CD32	2.4G2	B	MPI*
CD28	37.51	IVR	MPI*
CD62L	MEL-14	DZ	MPI*
CD69	H1.2F3	DZ	BD Pharmingen
IFNγ	XMG1.2	DZ	MPI*
TNFα	XT22	DZ	MPI*
Thy1.2	53-2.1	DZ	BD Pharmingen
AP-IgG1	X56	ELISA	BD Pharmingen
AP-IgG2a	R19-15	ELISA	BD Pharmingen
AP-IgG2b	R12-3	ELISA	BD Pharmingen
Biotin-IgM	II/41	ELISA	BD Pharmingen
IgG#	R3-34	DZ	BD Pharmingen
CD95	JO2	A	BD-Pharmingen

Für die Zellisolation und für die Messung der Proben am Durchflusszytometer wurden Fluoreszenz-konjugierte Antikörper verwendet. In Tabelle 2 sind die verwendeten Fluorochrome dargestellt.

Tabelle II: verwendete Fluorochrome mit ihren Extinktions- und Emissionsmaxima

Fluoreszenzkonjugat	Extinktionsmaximum (λ in nm)	Emissionsmaximum (λ in nm)
Cy5	650	670
FITC	495	519
PE	480;565	578
PE / Cy7	480;565;743	767
7AAD	488	655

Zur Bestimmung apoptotischer Zellen wurde FITC-gekoppeltes Annexin-V Protein verwendet. Für die magnetische Sortierung wurde ein, an Mikrokügelchen (Microbeads) gekoppelter, monoklonaler anti-CD8α Antikörper verwendet.

3.6 Versuchstiere

Der Wildtypstamm C57BL/6 (H-2^b) wurde vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin oder von Charles River, Sulzfeld bezogen. Der OVA-TZR transgene Stamm OT-1 (H-2^b), dessen transgener TZR spezifisch für das $OVA_{257-264}$-Peptid (SIINFEKL) ist, wurde vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin bezogen.

IFN-γ-Rezeptor$^{-/-}$-Mäuse (H-2^b) und SVJ-129-Mäuse wurden ebenfalls von der BfR bezogen oder von Charles River, Sulzfeld bezogen. TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse, TLR4$^{-/-}$-Mäuse, TLR2$^{-/-}$-Mäuse und MyD88$^{-/-}$-Mäuse mit C57BL/6 (H-2^b) Hintergrund (Adachi *et al.*, 1998;Takeuchi *et al.*, 1999), wurden von Dr. Shizuo Akira zur Verfügung gestellt und in unseren Tierstalleinrichtungen gehalten. Die Mäuse wurden zur Organentnahme und Isolierung von Lymphozyten verwendet und hierfür mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Haltung der Tiere fand unter SPF (spezifisch Pathogen-frei)- Bedingungen statt und die Versuche wurden unter Befolgung des Deutschen Tierschutz Gesetzes durchgeführt.

4 Methoden

4.1 Bakterielle Zellkultur

20 ml LB Medium, bzw. TSB Medium wurden mit 50µl *S. typhimurium*, bzw. *L. monocytogenes* Stock-Aliquots angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach Überimpfen in 200 ml LB Medium, bzw. TSB Medium am nächsten Tag, wurden die Bakterien bei einer OD von 0,8 pelletiert und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Aliquotierte Bakterienstocks wurden in PBS, 10% Glyzerin bei -80°C tiefgefroren. Der Bakterientiter wurde am nächsten Tag über Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf LB-Platten bestimmt.

4.2 Infektion von Mäusen

Mäuse wurden mit dem *S. typhimurium* Stamm SL7207OVA infiziert. Dieser *Salmonellen*-Stamm exprimiert das Plasmid-codierte Ovalbumin $OVA_{257-264}$-Peptid, SIINFEKL. *AroA⁻-Salmonellen* weisen Mutationen in Genen auf die für Enzyme im Biosyntheseweg von Aromaten kodieren (Hoiseth and Stocker, 1981). Dadurch ist das Pathogen von einer Versorgung mit Aromaten durch den Zellstoffwechsel des Wirtes abhängig. Diese Abhängigkeit wirkt sich limitierend auf die Replikationsfähigkeit der *Salmonellen* aus, so dass der Stamm als attenuiert gilt. Außerdem wurden Mäuse mit virulenten *Salmonellen* (SL1344), $OVA_{257-264}$-Peptid-(SIINFEKL)-exprimierenden SL1344 OVA-*Salmonellen* sowie mit *L. monyocytogenes* (L.m.OVA) Stamm EGD infiziert. L.m.OVA Stamm EGD exprimiert eine verkürzte Version des Ovalbumin Proteins.

Für die Infektion wurden Bakterien Aliquots entsprechend der Infektionsdosis (5 x 10^3 L.m.OVA, 5 x 10^5 SL7207OVA, 1 x 10^3 SL1344 bzw. SL1344 OVA) mit sterilem PBS verdünnt. Die Bakterien wurden in einem Volumen von 200µl aufgenommen und intravenös in die Schwanzvenen der Mäuse injiziert. Die Infektionsdosis wurde durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe verifiziert.

4.3 Makroskopische Untersuchung der Milz und Bakterientiter-bestimmung

Um die Milzgröße und bakterielle Titer infizierter Gewebe zu bestimmen, wurden infizierte Mäuse per Genickbruch getötet und Milz sowie Leber entnommen. Die Milz wurde auf der Feinwaage gewogen, um gegebenenfalls eine Splenomegalie zu bestimmen. Im Anschluss daran folgte das Homogenisieren von Milz und Leber in PBS. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des homogenisierten Gewebes auf LB Platten, LB Platten + Ampicillin oder MacConkey Platten ausplattiert. Bakterientiter wurden nach Inkubation bei 37°C am nächsten Tag bestimmt.

4.4 Zellfärbung und Zellanalyse am Durchflusszytometer

4.4.1 Isolation von Lymphozyten aus der Milz

Für die Aufreinigung lymphoider Zellen wurden die Milzen entnommen. Nach dem Passieren durch Metallsiebe, wurden die roten Blutkörperchen mit Erythrozyten-Lyse-Puffer lysiert. Die Lyse wurde nach 4 Minuten mittels Zugabe von DMEM Komplettmedium beendet. Nach zweimaligem Waschen und Zentrifugieren (1500 U/min, 5 min) wurden die Milzzellen unter dem Mikroskop gezählt.

4.4.2 Oberflächenfärbung von Milzzellen

Die auf 2 x 10^6 Zellen/100µl eingestellte Einzelzellsuspensionen wurden zum Minimieren unspezifischer Antikörper-Bindungen mit Ratten IgG (1%), CD16 mAk und CD32 mAk (1%), für 10 min auf Eis inkubiert. Die Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern (s. Tabelle I und II) fand im Anschluß daran für 30 min auf Eis statt. Die Zellen wurden mit PBS, 0,5% BSA gewaschen und in frischem PBS, 0,5% BSA aufgenommen. Kurz vor der Messung wurden 5µl 7-AAD pro Probe zugegeben.

4.4.3 Intrazelluläre Zytokin-Färbung

Aufgereinigte Milzzellen (4.4.1) wurden nach Erythrozyten-Lyse in DMEM Komplettmedium aufgenommen, abzentrifugiert (1500 U/min, 5min) und unter dem

Mikroskop gezählt. Um *ex-vivo* die Zytokinproduktion der Lymphozyten messen zu können wurde im Folgenden eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt (Mittrucker *et al.*, 2000a). Dafür wurden 4 x 10^6 Zellen in einem Volumen von 1ml DMEM Komplettmedium aufgenommen und im Brutschrank bei 37°C, 5%CO_2 mit 10^{-6} M $OVA_{257-264}$-Peptid (SIINFEKL) (Jerini Bio Tools), hitzeinaktivierten Salmonellen (HKS), oder CD3 mAk (1,35 µg/ml) und CD28 mAk (1,7 µg/ml) für 5 Stunden inkubiert. Um den zellulären Proteintransport zur Zellmembran zu unterbinden und somit eine Anreicherung von Proteinen in der Zelle zu erreichen, wurde 30 min nach Beginn der Inkubation Brefeldin A zugegeben.

Nach Zugabe von DMEM Komplettmedium und dem Zentrifugieren der Zellen (1500 U/min und 4°C für 5 min.) folgte die Oberflächenfärbung der Zellen, wie bereits unter 4.4.2 beschrieben, mit Fluoreszenz-gekoppelten mAk (s. Tabelle 1 und 2) für 30 min auf Eis. Nach Waschen mit PBS folgte die Fixierung der Zellen mit 200µl Fixierungslösung (3.4) für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Fixierung der Zellen wurde mit PBS, 0,5% BSA abgestoppt. Im Folgenden wurden die Zellen gewaschen und abzentrifugiert (1500 U/min, 5 min, 4°C). Im Anschluss daran wurden die Zellmembranen permeabilisiert. Dazu wurden die Zellen in 200µl Permeabilisierungs-Puffer (3.4) inklusive Ratten IgG, CD16 mAk und CD32 mAk zum Block unspezifischer Antikörperbindung resuspendiert und die Proben für 10 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Es folgte die intrazelluläre Färbung mit sättigenden Mengen monoklonaler Antikörperkonjugate (TNF-α mAk, IFN-γ mAk) für 45 min. bei Dunkelheit und auf Eis. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Zellen in PBS, 0,5% BSA aufgenommen und bis zur Messung auf Eis gelagert.

4.4.4 Aufreinigung von $CD8^+$ T Zellen mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung (MACS)

Naive $CD8^+$ T Zellen wurden aus 6 Wochen alten OT-1 Mäusen isoliert. Dabei wurden wie unter 4.4.1 bereits beschrieben, Einzelzellsuspensionen der Milzen hergestellt. Nach Zentrifugation der Zellen (1500 U/min, 5min, 4°C) wurde eine Zellsuspension mit 10^7 Zellen pro 90µl in MACS-Puffer (3.4) erstellt. Nach Zugabe von magnetischen Microbeads an die CD8α mAk gekoppelt waren, folgte eine

Inkubation für 15 min bei 4°C. Nach Äquilibrierung der LS-Separatorensäulen mit MACS-Puffer folgte Beladung mit 10^8 Zellen in 500µl MACS-Puffer. Hierbei fand eine Bindung der an magnetische Microbeads gebundene $CD8^+$ T Zellen im Magnetfeld der Separatorensäulen statt. Nach dem Auswaschen ungebundener Zellen wurden die mit Mikrokügelchen-gekoppelten $CD8\alpha^+$ T-Zellen von der Säule eluiert, indem die Separatorensäulen aus dem Magnetfeld entfernt wurden.

4.4.5 Adoptiver Transfer von Milzzellen

In dem hier verwendeten Zell-Transfermodell werden Zellen übertragen die sich nur im Thy1 (CD90)-Lokus unterscheiden. So werden $Thy1.2^+$ (CD90.2) Donorzellen in $Thy1.1^+$ (CD90.1) Rezipienten übertragen. Das ermöglicht die Unterscheidung von Donor- und Rezipientengewebe unabhängig der Spezifität der transferierten Lymphozyten. Wie unter 4.4.1 beschrieben wurden Einzelzellsuspensionen aus $Thy1.2^+$ C57BL/6- Mäusen oder $Thy1.2^+$ TZR-transgenen. OT-1 Mäusen aufgereinigt. Diese aufbereiteten Zellen wurden adoptiv in kongene $Thy1.1^+$ Rezipienten transferiert. Hierbei wurden maximal 5 x 10^6 Zellen intravenös in die lateralen Schwanzvenen der Rezipienten injiziert.

4.4.6 Färbung von Milzzellen mit MHC-Klasse-I-Tetrameren

MHC-Klasse-I-Tetramere setzen sich aus modifizierten Varianten der vollständigen cDNA-Konstrukte von $H\text{-}2K^b$ und der humanen β2m-Kette zusammen und wurden freundlicherweise von Dr. D. Busch zur Verfügung gestellt. $H\text{-}2K^b/OVA_{257\text{-}264}$-Tetramere wurden wie in der Literatur beschrieben hergestellt (Busch *et al.*, 1998).
Für die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer wurden 2 x 10^6 Zellen für 10 min bei 4°C mit Ratten IgG Ak, CD16 Ak, CD32 Ak und Streptavidin (Molecular Probes) in PBS, 0,5% BSA 0,01% Natriumazid inkubiert. Danach folgte die Färbung mit CD8α mAb, CD62L mAk und MHC-Klasse-I-$OVA_{257\text{-}264}$-Tetrameren für 60 min bei 4°C. Die Zellen wurden daraufhin mit PBS, 0,5 %BSA 0,01% Natriumazid gewaschen und in 100µl PBS, 0,5% BSA 0,01% Natriumazid aufgenommen.

4.4.7 CFSE-Markierung von Zellen

Um die Proliferation von Zellen verfolgen zu können, wurden diese vor Transfer in einen Rezipienten mit CFSE markiert. Bei dieser Markierung lagert sich der Farbstoff in der Zelle ein und wird somit bei jedem Teilungsschritt der Zelle an die Tochterzellen weitergegeben und dementsprechend verdünnt (Lyons and Parish, 1994).

Milzzellen (2 x 10^7/ml) aus Mäusen wurden mit PBS gewaschen und mit 4µM CFSE bei RT und Dunkelheit für 4 min inkubiert bevor die Markierung mit RPMI Vollmedium gestoppt wurde. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen gezählt und in einem für den Transfer geeignetem Volumen PBS (5 x 10^6 Zellen/200µl) aufgenommen und intravenös in Maus-Rezipienten injiziert. Zur Analyse der Proliferation wurden Milzen aus den Rezipienten entnommen und nach Aufreinigung der Milzzellen fand die GeoMean-Analyse der CFSE-Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer unter Verwendung der Diva-Software, statt.

4.4.8 Messung und Analyse

Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer FACS Canto mit Hilfe der Diva Software. Für die Auswertung der Zellanalyse diente das Programm FCS-Express 2 bzw. FCS-Express 3. Bei der Messung unfixierter Proben wurden tote Zellen durch Anfärben mit 7-AAD ausgeschlossen, lebende Lymphozyten wurden durch FSC und SSC im Zweiparameter-Punktdiagramm (Dot Plot), welches Informationen über Größe und Granularität der Zellen liefert, definiert. Fluoreszenzintensitäten oder Frequenzen wurden im Histogramm oder Dot Plot dargestellt.

4.5 Antikörper-Bestimmung aus murinem Serum

4.5.1 Gewinnung von Serum aus murinem Blut

Zur Gewinnung von Serum aus murinem Blut wurden Mäuse per Genickbruch getötet und Herzblut mit Hilfe einer 1-ml Spritze nach Punktion des Herzens entnommen. Das Blut wurde in Microtainer™ SST Röhrchen (BD) überführt und

für die Koagulation mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran konnte durch Zentrifugation bei 10000 rpm für 5 min das Serum isoliert werden.

4.5.2 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) zur Detektion *Salmonellen*-spezifischer Antikörper

Dieser Test ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Für die Bestimmung *Salmonellen*-spezifischer Antikörper wurden Immuno-Maxisorp ELISA-Platten mit 50µl hitzeinaktivierten *Salmonellen* (HKS) ($1x10^8$/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit PBS gewaschen und im Anschluss mit PBS, 0,1% BSA bei 4°C abgesättigt. Es wurde mit PBS gewaschen und eine serielle Verdünnung des Serums auf die Platten gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween20 fand die Inkubation mit alkalischer Phosphatase (AP)-gekoppelten monoklonalen Antikörpern (mAk) (1µg/ml in PBS, 0,1% BSA) statt. Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich um mAk die spezifisch für die Ig Isotypen IgM, IgG1, IgG2a und IgG2b sind. Als Kontrolle wurde Serum, Antikörper oder nur Medium benutzt. Die Antikörper wurden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch erneutes Waschen der Platten wurde der überschüssige zweite Antikörper mit PBS, 0,1% BSA, 0,05% Tween20 ausgewaschen. Anschließend wurden 50µl des Chromogens *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) zugegeben. Die alkalische Phosphatase spaltet den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat ab und es entsteht *p*-Nitrophenol, welches schwach gelb ist. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von 50µl 0,5M EDTA (pH 8) gestoppt.

Die Farbreaktion wurde am Spectramax Spektrophotometer durchgeführt, indem die Absorption bei 405 nm gemessen wurde. Die Intensität der Farbe verhält sich dabei proportional zu der Konzentration des entstandenen Nitrophenols und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe. Die Auswertung der ELISA-Ergebnisse fand nach der Methode der Endpunkt-Verdünnung statt.

4.6 Apoptose Assay

Die Rate an programmiertem Zelltod (Apoptose) innerhalb einer Zellpopulation kann mit Annexin-V-Färbung ermittelt werden. Der Verlust der Membranintegrität und der damit verbundene Wechsel von Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Zellmembranseite, gilt als ein frühes Zeichen von Apoptose. Phosphatidylserin kann durch Fluorochrom-gekoppeltes Annexin-V gebunden werden. Die Inkubation von 5 x 10^5 Zellen mit 5 µl Annexin-V in 100µl Annexin-V-Bindungspuffer wurde für 15 min. bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Positiv Kontrolle wurden Zellen zusätzlich für 4 Stunden mit monoklonalem Fas Antikörper (0,1µg/ml) inkubiert. Nach Bindung von Fas-mAk an Fas auf der Oberfläche von T-Zellen wird der programmierte Zelltod in den so behandelten Zellen eingeleitet. Auch bei nekrotischen Zellen kann aufgrund der permeabilisierten Membran Annexin-V binden, daher wurde nach der Annexin-V-Färbung eine Ausschlussfärbung mit 7-AAD (3µl) durchgeführt. Bei dem verwendeten Farbstoff 7-AAD handelt es sich um einen Farbstoff, der im Zellkern toter Zellen in die DNA interkaliert. Im Anschluss daran konnten apoptotische Zellen durchflusszytometrisch ermittelt werden.

4.7 Quantitative Reverse Transkriptase PCR

4.7.1 Isolierung und Aufreinigung von RNA aus Zellgewebe

Für die Isolierung von RNA aus Gewebe wurde die TRIzol® Reagenz Präparationsmethode (Gibco) verwendet. Gewebe wurde unter Verwendung eines Ultra-Turrax Homogenisators in 1 ml Trizol (Gibco) zerkleinert und im Anschluss bei -80° C gelagert. Nach dem Auftauen der Proben wurde RNA gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die Menge an RNA wurde durch Messung bei 260/280 OD abgeschätzt, die Reinheit und absolute Menge wurde mit Hilfe des Bioanalyzers 2100 (Agilent Technologies) bestimmt.

4.7.2 cDNA-Synthese

Für die Generierung von cDNA wurden 2µg Gesamt-RNA (10µl) des RNA-Matrizen-Ansatzes (0,2 mg/ml) mit 1µl Random Hexamer-Primern (250 µg/ml) gemischt und für 10 min bei 65°C inkubiert und danach auf Eis gelagert. Nach 5 min auf Eis wurden 4µl 5x First Strand Buffer, 1µl 10mM dNTPs, 2µl 0,1M DTT und 1µl SuperScript III Reverse Transkriptase als Reaktionsmix zu der Probe gegeben. Der Ansatz wurde zunächst für 5 min bei 25 °C, danach für 60 min bei 50°C und schließlich für 15 min bei 70°C inkubiert, um den Vorgang der reversen Transkription zu stoppen.

4.8 Real-time quantitative PCR

Die Real time quantitative PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung der DNA basiert auf der Fluoreszenz-Messung am Ende eines jeden PCR-Zykluses. Hierzu wird eine Sonde benutzt, die an ihrem einen Ende mit einem Quencher, an ihrem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert wird. Wenn die Taq-Polymerase die zusätzlich eine Exonuclease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Dabei gilt: Je mehr Matrize zu Beginn der Reaktion vorliegt, desto weniger PCR-Zyklen braucht es, um ein Signal zu erhalten, dass sich signifikant vom Hintergrundschwellenwert, abhebt. Der Vergleich der Schwellenwert Zyklen für eine spezifische Matrize in jedem Zyklus führt zu einer semi-quantitativen Evaluierung der Orginal-Matrizen-Konzentration, da nur mit einem internen Standard verglichen wird.

Für die semi-quantitative Real-time PCR wurde RNA wie unter 4.8.1 beschrieben isoliert und wie unter 4.8.2 beschrieben in cDNA umgeschrieben. Die PCR wurde mit Hilfe des ABI Prism 7900 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) durchgeführt und alle PCR Reaktionen liefen insgesamt 40 Zyklen mit je 20

Sekunden bei 94°C und 60 Sekunden bei 60°C. Es wurden TaqMan® Low-Density Custom Array-Platten verwendet. Dafür wurde 1µg cDNA in 200µl PCR Master Mix (TaqMan®) in Doppelbestimmung analysiert. Die Ergebnisse des Low-Density Arrays wurden mit Hilfe der SDS 2.2 Software (Applied Biosystems) und Microsoft Excel ausgewertet. Die relative Konzentration der analysierten Transkripte wurde über Standardisierung auf 18S rRNA mit Hilfe der Δ ct-Methode (x-facher Unterschied = $2^{-\Delta Ct}$) bestimmt.

Die für die semi-quantitative Real-time PCR verwendeten Primerpaare wurden bei h://products.appliedbiosystems.com, Katalog ID. 6006696 bestellt.

4.9 Graphische Darstellung und Statistik

Alle Graphen wurden mit den Programmen GraphPadPrism und CorelDraw11 (Corel Corporation) erstellt. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Programms zur Berechnung statistischer Signifikanzen innerhalb der GraphPad Prism Software (GraphPad) bestimmt.

5 Ergebnisse

5.1 TLR-unabhängige, erworbene Immunantwort nach Infektion mit *S. typhimurium*

Die Infektion mit *S. typhimurium* ruft in Mäusen eine starke Entzündungsreaktion hervor. Abhängig von dem verwendeten *Salmonellen*-Stamm, der Infektionsdosis und dem infizierten Mausstamm kann die Infektion zum Multiorganversagen durch septischen Schock führen. Die Erkennung von *Salmonellen* erfolgt unter Beteiligung von TLR (Toll-like Receptors), die auch auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems zu finden sind. TLR erkennen konservierte mikrobielle Strukturen, unter anderem auch Lipopolysaccharid (LPS), das als wesentliche Komponente in der Zellwand Gram-negativer Bakterien enthalten ist. TLR4 ist der zentrale LPS-erkennende Rezeptor. In Kombination mit dem LPS-bindenden Protein LBP, CD14 und MD2 bindet LPS an TLR4. Die Erkennung mikrobieller Bestandteile aktiviert über verschiedene Signalkaskaden Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NFκB und IRF3. Als Folge dieser Aktivierung werden Entzündungsmediatoren sowie Zytokine und Chemokine exprimiert, die wiederum die Rekrutierung und Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems unterstützen.

MyD88 dient im TLR-Signalweg als zentrales Adaptermolekül und tritt über seine TIR-Domäne auch mit TLR4 in Kontakt. Zusätzlich kann nach Ligandenbindung an TLR4 ein MyD88-unabhängiger Weg induziert werden, dieser leitet die Signale über die Moleküle TRAM und TRIF weiter. Sowohl TLR als auch MyD88 spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität gegen verschiedene Krankheitserreger so auch in der Immunantwort nach *Salmonellen*-Infektion. (Laroux *et al.*, 2005;Poltorak *et al.*, 1998).

Obgleich die zentrale Funktion von TLR und des TLR-Adapterproteins MyD88 für die angeborene Immunantwort gegen *Salmonellen* gezeigt werden konnte (Feuillet *et al.*, 2006;Weiss *et al.*, 2004), war die Rolle dieser Proteine für die Generation und Funktion der erworbenen Immunantwort gegen diesen Erreger unklar und sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Frühere Studien konnten zeigen, dass neben TLR4 auch TLR2 an der Immunantwort gegen virulente *Salmonellen* beteiligt

ist (Weiss *et al.*, 2004). Für die Analyse der erworbenen Immunantwort wurden daher zusätzlich zu C57BL/6-Mäusen, auch die auf C57BL/6-Hintergrund gezüchteten MyD88-, TLR2-, TLR4- und TLR2+4-defiziente Mäuse mit *S. typhimurium* infiziert. Die Infektion mit virulenten *Salmonellen* führt in Mäusen des C57BL/6-Hintergrundes innerhalb kurzer Zeit zum Tod. Hierbei spielt das *Nramp*-1-Molekül eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung dieser intrazellulären Pathogene (Jabado *et al.*, 2003;Vidal *et al.*, 1995). C57BL/6-Mäuse exprimieren ein *Nramp*-1-Allel dessen mRNA aufgrund einer Punktmutation zu unstabil für eine erfolgreiche Translation ist, wodurch das *Nramp*-1-Protein nicht synthetisiert werden kann. Ohne ein funktionelles *Namp*-1-Protein (*Nramp*-1^s) können Phagozyten die Vermehrung virulenter *Salmonellen* nicht kontrollieren, das führt innerhalb weniger Tage zum Tod der infizierten Mäuse (Vidal *et al.*, 1995). Um die erworbene Immunantwort nach *Salmonellen*-Infektion trotzdem untersuchen zu können wurde daher der attenuierte *aro*A^- *Salmonellen*-Stamm SL7207OVA verwendet. Die *aro*A^--*Salmonellen* sezernieren das als Surrogat-Antigen genutzte $OVA_{257-264}$-Peptid (SIINFEKL). Dieses Peptid ist in den hier infizierten Mäusen des H-2^b-Hintergrundes immundominant und ermöglicht eine Analyse SIINFEKL-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen nach Infektion mit SL7207OVA (16).

5.1.1 Infektionsverlauf nach Infektion von TLR2-, TLR4-, TLR2+4- undMyD88-defizienten Mäusen mit SL7207OVA

Die intravenöse Infektion von TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defizienten Mäusen mit $5x10^5$ SL7207OVA führte zu einer starken Infektion von Milz und Leber dieser Mäuse (Abb.1). Sowohl in TLR2+$4^{-/-}$-Mäusen als auch in MyD$88^{-/-}$-Mäusen erreichten die Titer an Tag 20 nach Infektion über 10^5 *Salmonellen* pro Organ. Hingegen zeigten sowohl TLR$4^{-/-}$-Mäuse als auch die Kontroll-Mäuse eine deutlich geringere bakterielle Last. Während der gesamten Infektion wiesen TLR$2^{-/-}$-Mäuse die niedrigsten Bakterientiter auf (Abb.1). Bis Tag 40 nach Infektion wurde in allen Tieren ein allgemeiner Rückgang der bakteriellen Titer beobachtet. Nach 2 Monaten hatten C57BL/6-Mäuse die Infektion überwunden und die *Salmonellen* geklärt (Abb. 2). Im Gegensatz dazu wiesen ein Teil der TLR2+4- als auch der MyD88-defiziente Mäuse bakterielle Titer in Milz und Leber noch nach 4 bis 5

Monaten auf (Abb.2). Obwohl die *Salmonellen* nicht vollständig beseitigt werden konnten, überlebten aber alle TLR2+4$^{-/-}$-und MyD88$^{-/-}$-Mäuse die Infektion.

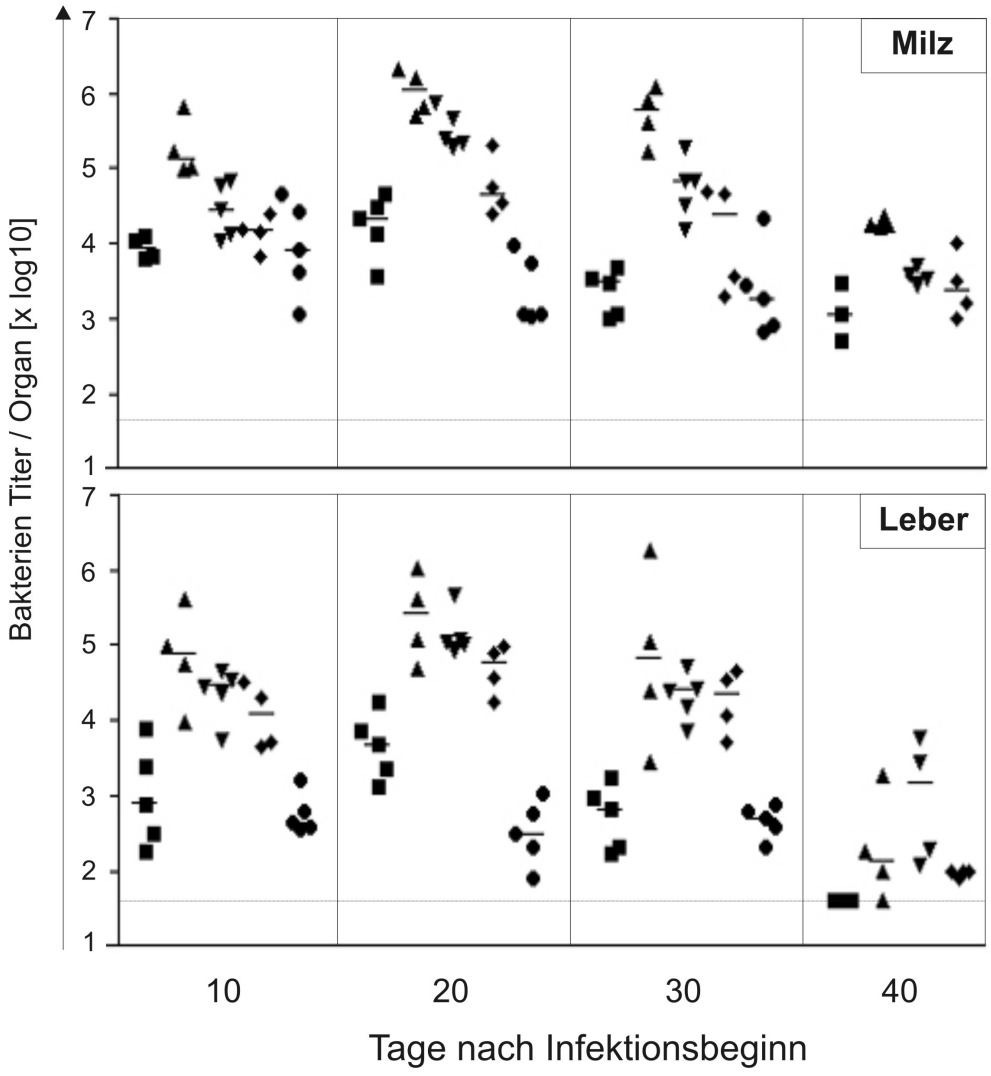

Abb.1 Bakterientiter in Milz und Leber nach Infektion von C57BL/6-Mäusen (■), MyD88$^{-/-}$-Mäusen (▲), TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen (▼), TLR4$^{-/-}$-Mäusen (♦) und TLR2$^{-/-}$-Mäusen (●) mit *S. typhimurium*. Die Mäuse wurden mit 5x10^5 SL7207OVA intravenös (i.v.) infiziert und an den angegebenen Tagen nach Infektionsbeginn getötet. Milz und Leber wurden homogenisiert und auf MacConkey Selektiv-Agarplatten ausplattiert um die Anzahl der Kolonien-bildenden Einheiten (CFU) zu bestimmen. Gezeigt sind Titer einzelner Mäuse und Medianwerte. Das Nachweislimit lag bei 40 Bakterien pro Organ.

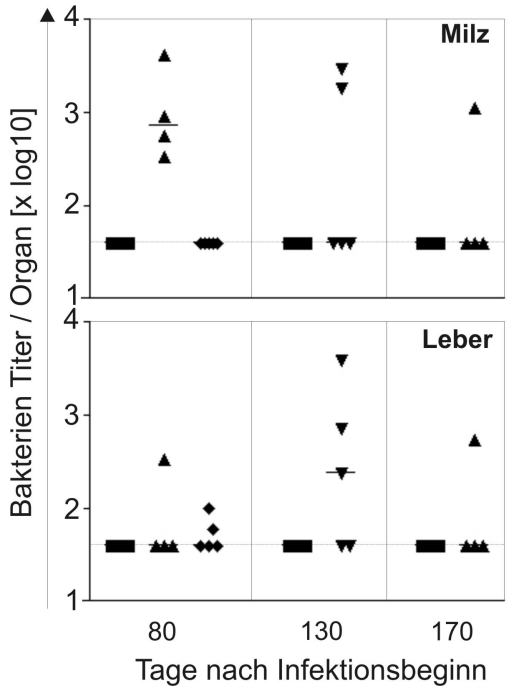

Abb.2 Bakterientiter in Milz und Leber nach Infektion von C57BL/6-Mäusen (■), MyD88$^{-/-}$-Mäusen (▲), TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen (▼), TLR4$^{-/-}$-Mäusen (♦) und TLR2$^{-/-}$-Mäusen (●) mit *S. typhimurium.* Die Mäuse wurden mit 5x10^5 SL7207OVA i.v. infiziert und an den angegebenen Tagen nach Infektionsbeginn getötet. Milz und Leber wurden homogenisiert und auf MacConkey Selektiv-Agarplatten ausplattiert um die CFU zu bestimmen. Gezeigt sind Titer einzelner Mäuse und Medianwerte. Das Nachweislimit lag bei 40 Bakterien pro Organ.

5.1.2 Zunahme in Milzgröße und –zellularität nach *S. typhimurium*-Infektion

Nach Infektion mit *S. typhimurium* konnte eine Zunahme in Größe und Gewicht der Milzen beobachtet werden (Abb.3). Insbesondere TLR2+4$^{-/-}$- und TLR4$^{-/-}$-Mäuse zeigten neben einer auffälligen Splenomegalie eine Zunahme in der Gesamtzellzahl der Milz. Diese Zunahme der Zellzahl war im Fall der TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse besonders an Tag 30 deutlich ausgeprägt und spiegelte die hohe bakterielle Last in den Milzen der Mäuse wieder. Im Gegensatz dazu blieben trotz der hohen bakteriellen Titer die Milzen in MyD88$^{-/-}$-Mäusen vergleichsweise klein und es ließ sich nur eine geringfügige Zunahme in Größe und Zellularität nachweisen. Die Milzen infizierter, TLR2-defizienter Mäuse nahmen während der gesamten Infektion nur unwesentlich an Gewicht und Größe zu und auch die bakterielle Last war, verglichen mit Wildtyp-Kontrollen, von Infektionsbeginn an niedrig. In allen infizierten Mäusen war die Zunahme in Milzgröße und -Zellularität nur geringfügig durch eine Zunahme der CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellpopulation bedingt (Abb.4).

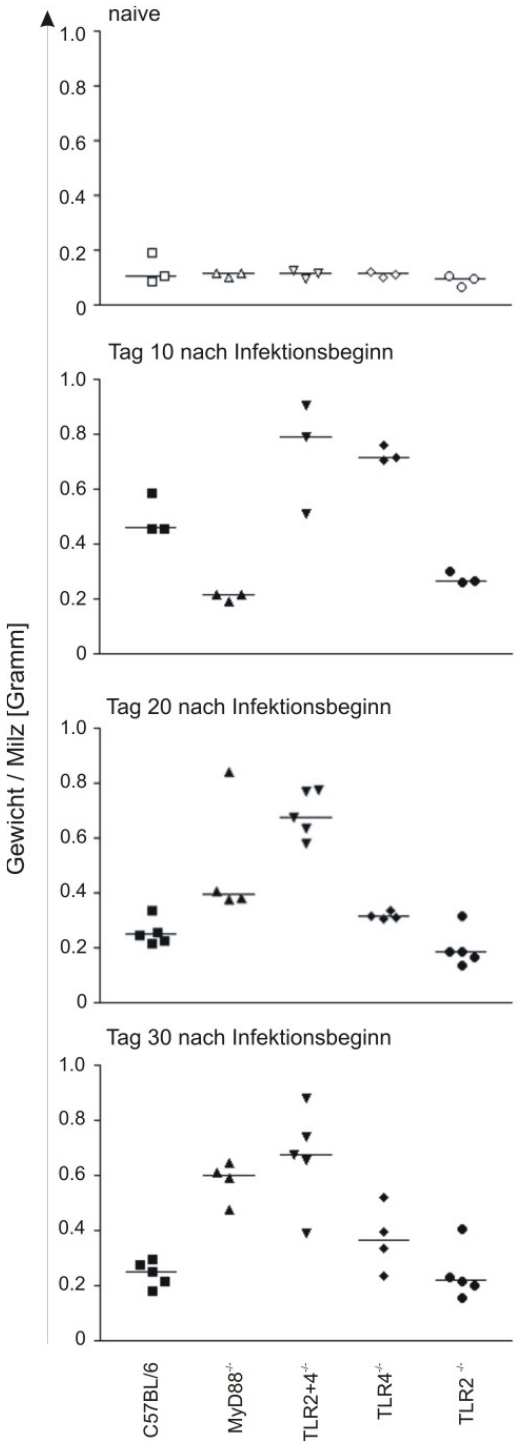

Abb.3 Splenomegalie in C57BL/6-Mäusen (■), MyD88$^{-/-}$-Mäusen (▲), TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen (▼), TLR4$^{-/-}$-Mäusen (♦) und TLR2$^{-/-}$-Mäusen (●) nach Infektion mit *S. typhimurium*. Die Mäuse wurden mit 5x10^5 SL7207OVA i.v. infiziert und an den angegebenen Zeitpunkten nach Infektionsbeginn getötet. Die Milzen wurden entnommen und auf einer Feinwaage gewogen. Das Milzgewicht ist in Gramm / Milz angegeben.

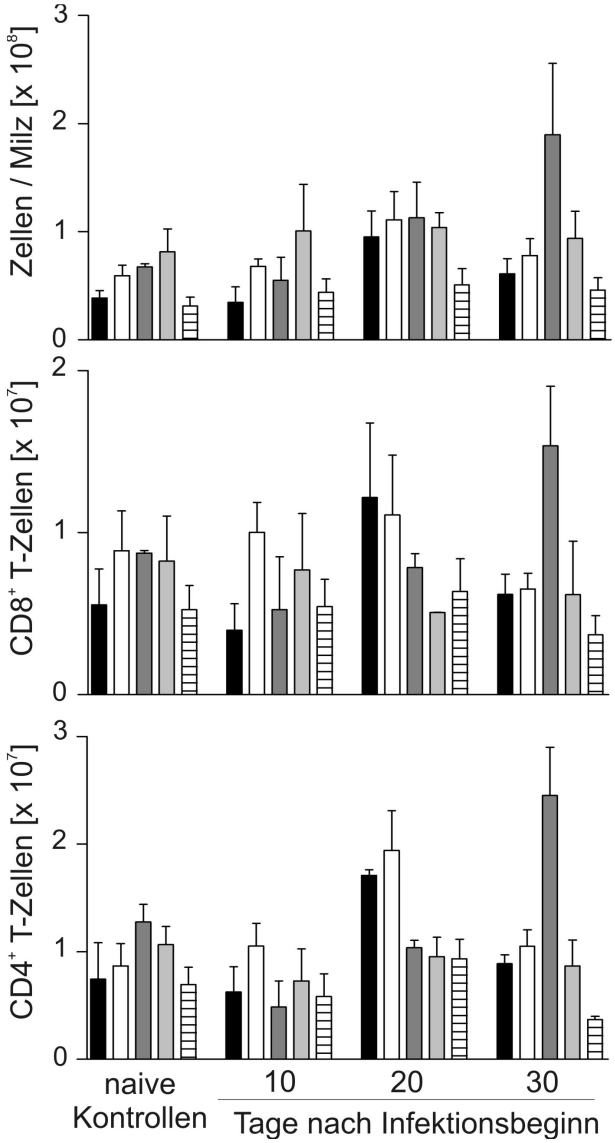

Abb.4 Änderung der Milzzellularität nach Infektion mit *S. typhimurium*. MyD88$^{-/-}$-Mäuse (weiße Balken), TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse (dunkelgraue Balken), TLR4$^{-/-}$-Mäuse (hellgraue Balken), TLR2$^{-/-}$-Mäuse (gestreifte Balken) und C57BL/6-Mäuse (schwarze Balken) wurden mit $5x10^5$ SL7207OVA *Salmonellen* infiziert. An den angegebenen Zeitpunkten nach Infektionsbeginn wurden die Mäuse getötet, die Milzen entnommen und homogenisiert. Nachdem die Zellen der Milz gezählt worden waren, konnte nach Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern der prozentuale Anteil von CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Daraus wurde die Anzahl der CD4$^+$ and CD8$^+$ T-Zellen in der Milz berechnet. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 4 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung.

5.1.3 TLR2$^{-/-}$-Mäuse, TLR4$^{-/-}$-Mäuse, TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse und MyD88$^{-/-}$-Mäuse generieren eine *Salmonellen*-spezifische CD8^{+} T-Zellantwort

Nachdem gezeigt wurde, dass TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse trotz hoher bakterieller Last eine Infektion mit *S. typhimurium* überleben, sollte ermittelt werden, ob eine *Salmonellen*-spezifische CD8^{+} T-Zellantwort in den Mäusen gebildet werden konnte.

C57BL/6-Mäuse, TLR2$^{-/-}$-Mäuse, TLR4$^{-/-}$-Mäuse, TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse und MyD88$^{-/-}$-Mäuse wurden mit 5x10^{5} SL7207OVA intravenös (i.v.) infiziert und die *Salmonellen*-spezifischen CD8^{+} T-Zellen der Milz wurden an den jeweiligen Zeitpunkten mit Hilfe von H-2K^{b}-OVA$_{257-264}$-MHC-Klasse-I-Tetrameren analysiert (Abb.5). In C57BL/6-Mäusen konnten OVA$_{257-264}$-spezifische CD8^{+} T-Zellen bereits an Tag 10 nach Infektionsbeginn gemessen werden. Die spezifische CD8^{+} T-Zellantwort erreichte an Tag 20 ihr Maximum und nahm bis Tag 30 wieder ab (Abb.5). Sowohl in TLR2+4$^{-/-}$- als auch in TLR4$^{-/-}$-Mäusen konnte eine verstärkte CD8^{+} T-Zellantwort mit hohen Frequenzen an OVA$_{257-264}$-spezifischen CD8^{+} T-Zellen an Tag 10 und 20 nach Infektionsbeginn gezeigt werden. Im Vergleich dazu generierten TLR2$^{-/-}$- und auch MyD88$^{-/-}$-Mäuse nach *S. typhimurium*-Infektion eine OVA$_{257-264}$-spezifische CD8^{+} T-Zellantwort, die sich ähnlich zu der OVA$_{257-264}$-spezifischen CD8^{+} T-Zellantwort in Wildtyp-Kontrollen entwickelte (Abb.5).

IFN-γ stellt ein zentrales und essentielles Zytokin der Immunantwort gegen Infektionen mit intrazellulären Bakterien, insbesondere auch *S. typhimurium*, dar (Mittrucker and Kaufmann, 2000). Um die in TLR2$^{-/-}$-, TLR4$^{-/-}$-, TLR2+4$^{-/-}$- und MyD88$^{-/-}$-Mäusen generierten OVA$_{257-264}$-spezifischen CD8^{+} T-Zellen auf ihre Rolle als potentielle IFN-γ-sezernierende T-Zellen hin zu untersuchen, wurde eine intrazelluläre IFN-γ-Färbung nach *in-vitro*-Restimulation der Zellen durchgeführt. Hierzu wurden Milzzellen mit OVA$_{257-264}$-Peptid oder mit CD3 mAk und CD28 mAk restimuliert. Die Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk ermöglichte eine Aussage über die Anzahl der während der Infektion zu Effektor-T-Zellen ausdifferenzierten CD8^{+} T-Zellen. Daneben wurden die Milzzellen mit OVA$_{257-264}$-Peptid (SIINFEKL) restimuliert, um die SIINFEKL-spezifische CD8^{+} T-Zellantwort zu erfassen. Bereits ohne Restimulation zeigten einige CD8^{+} T-Zellen IFN-γ-Produktion. Diese spontane IFN-γ-Produktion war nach Infektion von TLR2+4-

defizienten Mäusen besonders hoch (Abb.6). Trotz der spontanen IFN-γ-Produktion, konnte jedoch die Restimulation mit SIINFEKL-Peptid die Frequenzen der IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen in allen Mäusen deutlich verstärken. Die stärkste spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort zeigten TLR2+4$^{-/-}$- und TLR4$^{-/-}$-Mäuse. In diesen Mäusen und in C57BL/6-Mäuse entsprach nach SIINFEKL-Peptid-Restimulation die IFN-γ-Produktion der $CD8^+$ T-Zellen in Frequenz und Anzahl der im Tetramer-Assay gezeigten $CD8^+$ T-Zellantwort.

Im Gegensatz dazu generierten MyD88$^{-/-}$-Mäuse trotz der mit C57BL/6-Mäusen vergleichbaren Frequenz und Anzahl an $OVA_{257-264}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen eine deutlich geringere IFN-γ Produktion nach SIINFEKL-Peptid-Restimulation.

Die Restimulation der Milzzellen mit CD3 mAk und CD28 mAk ergab in allen Mäusen eine deutliche Zunahme der Frequenz und auch der Anzahl der IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen (Abb.6). Auch in MyD88$^{-/-}$-Mäusen nahm nach Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk, sowohl der prozentuale Anteil als auch die Anzahl der IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen zu (Abb.6). Diese IFN-γ Produktion legt nahe, dass die geringe Anzahl an IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen nach $OVA_{257-264}$-Peptid-Restimulation nicht einem generellen $CD8^+$ T-Zell-Differenzierungsdefekt in MyD88$^{-/-}$-Mäusen zugrunde lag.

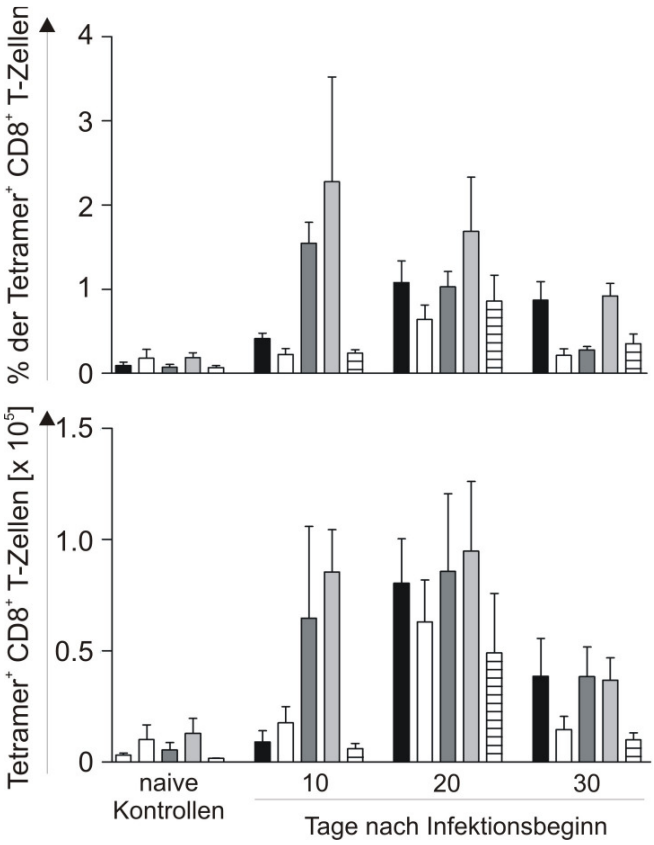

Abb.5 Frequenzen $OVA_{257-264}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen in $MyD88^{-/-}$-Mäusen (weiße Balken), $TLR2+4^{-/-}$-Mäusen (dunkelgraue Balken), $TLR4^{-/-}$-Mäusen (hellgraue Balken), $TLR2^{-/-}$-Mäusen (gestreifte Balken) und C57BL/6-Mäusen (schwarze Balken) nach *S. typhimurium*-Infektion. Die Mäuse wurden mit $5x10^5$ SL7207OVA i.v. infiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurden die Mäuse getötet, die Milzen entnommen und homogenisiert. Nach Färbung mit $OVA_{257-264}$-MHC-Klasse-I-Tetrameren wurde der prozentuale Anteil $OVA_{257-264}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 4 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung.

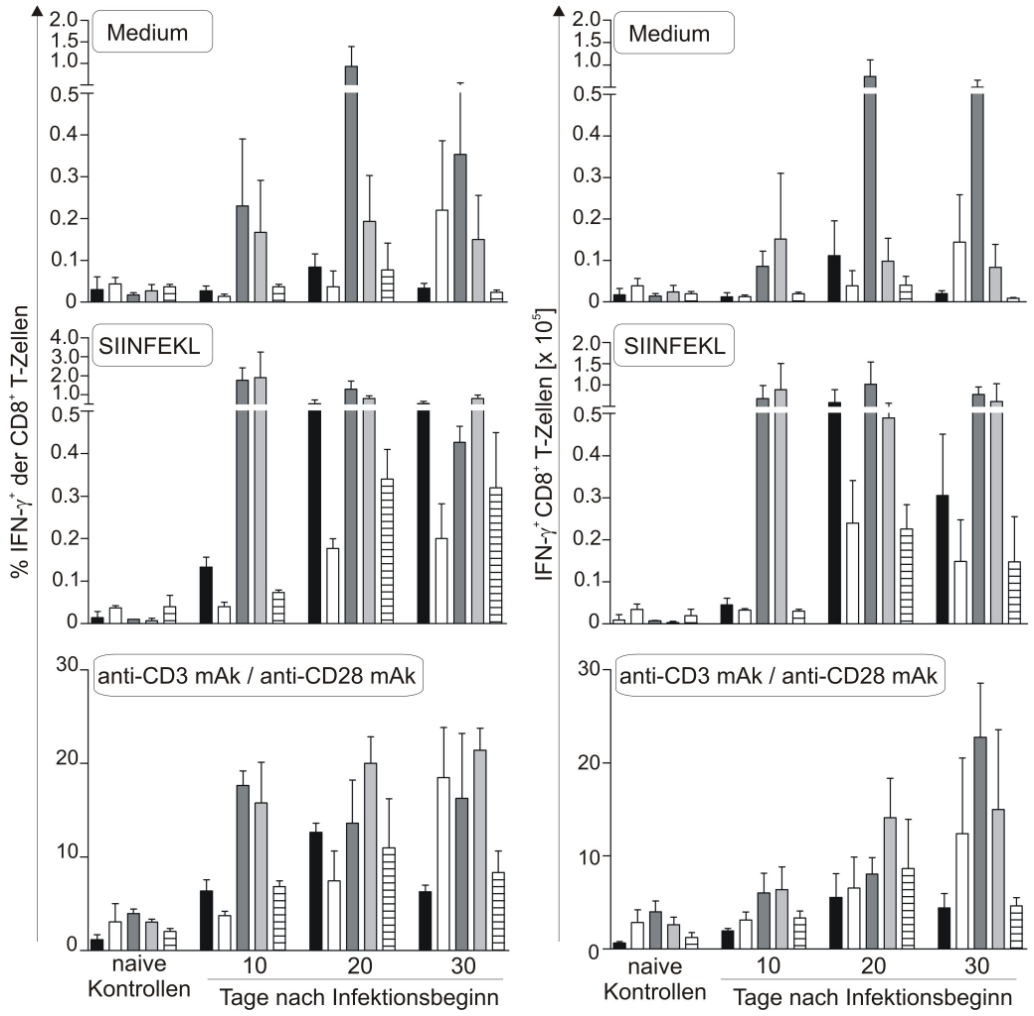

Abb.6 IFN-γ-Produktion nach *S. typhimurium*-Infektion. MyD88$^{-/-}$-Mäuse (weiße Balken), TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse (dunkelgraue Balken), TLR4$^{-/-}$-Mäuse (hellgraue Balken), TLR2$^{-/-}$-Mäuse (gestreifte Balken) und C57BL/6-Mäuse (schwarze Balken) wurden mit 5x10^5 SL7207OVA i.v. infiziert und an den angezeigten Zeitpunkten getötet. Die Milzen wurden entnommen, homogenisiert und mit $OVA_{257-264}$-Peptid (10^{-6} M) oder CD3 mAk und CD28 mAk restimuliert. Nach 5h wurde die IFN-γ-Produktion der CD8$^+$ T-Zellen durch intrazelluläre Zytokinfärbung am Durchflusszytometer bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 4 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung.

5.1.4 $CD4^+$ T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen, $TLR2^{-/-}$-Mäusen, $TLR4^{-/-}$-Mäusen, $TLR2+4^{-/-}$-Mäusen und $MyD88^{-/-}$-Mäusen produzieren IFN-γ nach Infektion mit *S. typhimurium*

Zusätzlich zur IFN-γ-Produktion Antigen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen wurde die IFN-γ-Produktion von $CD4^+$ T-Zellen in $TLR2^{-/-}$-, $TLR4^{-/-}$-, $TLR2+4^{-/-}$- und $MyD88^{-/-}$-Mäusen nach *S. typhimurium*-Infektion untersucht. Obwohl nach *S. typhimurium*-Infektion Flagellin-spezifische $CD4^+$ T-Zellen beschrieben wurden (McSorley *et al.*, 2000), konnte gezeigt werden, dass nach Übergang zur systemischen Infektionsphase die Expression von Flagellin in den *Salmonellen* unterbunden wird (Cummings *et al.*, 2005). Es ist zur Zeit kein immundominantes Epitop, das eine Detektion spezifischer $CD4^+$ T-Zellen ermöglicht, bekannt. Ein Surrogat-Antigen mit einem immundominanten $CD4^+$ T-Zellepitop stand ebenfalls nicht zur Verfügung. Um trotzdem die IFN-γ-Produktion von $CD4^+$ T-Zellen nach *S. typhimurium*-Infektion messen zu können, wurde die intrazelluläre Zytokinfärbung nach Restimulation mit hitzeinaktivierten *Salmonellen* (HKS), durchgeführt. Des weiteren wurde mit durch Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk das Ausmaß der Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen zu T_H1-Zellen ermittelt.

Ähnlich wie bei $CD8^+$ T-Zellen konnte auch bei $CD4^+$ T-Zellen eine starke spontane IFN-γ Produktion bereits ohne Restimulation beobachtet werden, die besonders bei Zellen aus $TLR2+4^{-/-}$-Mäusen deutlich ausgeprägt war. Restimulaton mit HKS induzierte IFN-γ-Produktion durch $CD4^+$ T-Zellen, jedoch war die IFN-γ-Produktion im Vergleich zu der spontanen IFN-γ-Produktion nur minimal höher (Abb.7). Hingegen ergab die Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk in allen infizierten Mäusen einen deutlichen Anstieg in Frequenz und Anzahl IFN-γ-produzierender $CD4^+$ T-Zellen. Ähnlich zu den $CD8^+$ T-Zellen entwickelte sich auch bei $CD4^+$ T-Zellen von $MyD88^{-/-}$-Mäusen die IFN-γ-Antwort nur langsam und erreichte erst im Laufe der Infektion hohe Werte (Abb.7). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass nach *S. typhimurium*-Infektion alle Mäuse $CD4^+$ T_H1-Zellen generieren können, und dass insbesondere in $TLR2+4^{-/-}$-Mäusen, und an Tag 30 ebenfalls in $TLR4^{-/-}$- und $MyD88^{-/-}$-Mäusen, die $CD4^+$ T_H1-Zellantwort sogar stärker ausgeprägt war als in den infizierten Kontrollen.

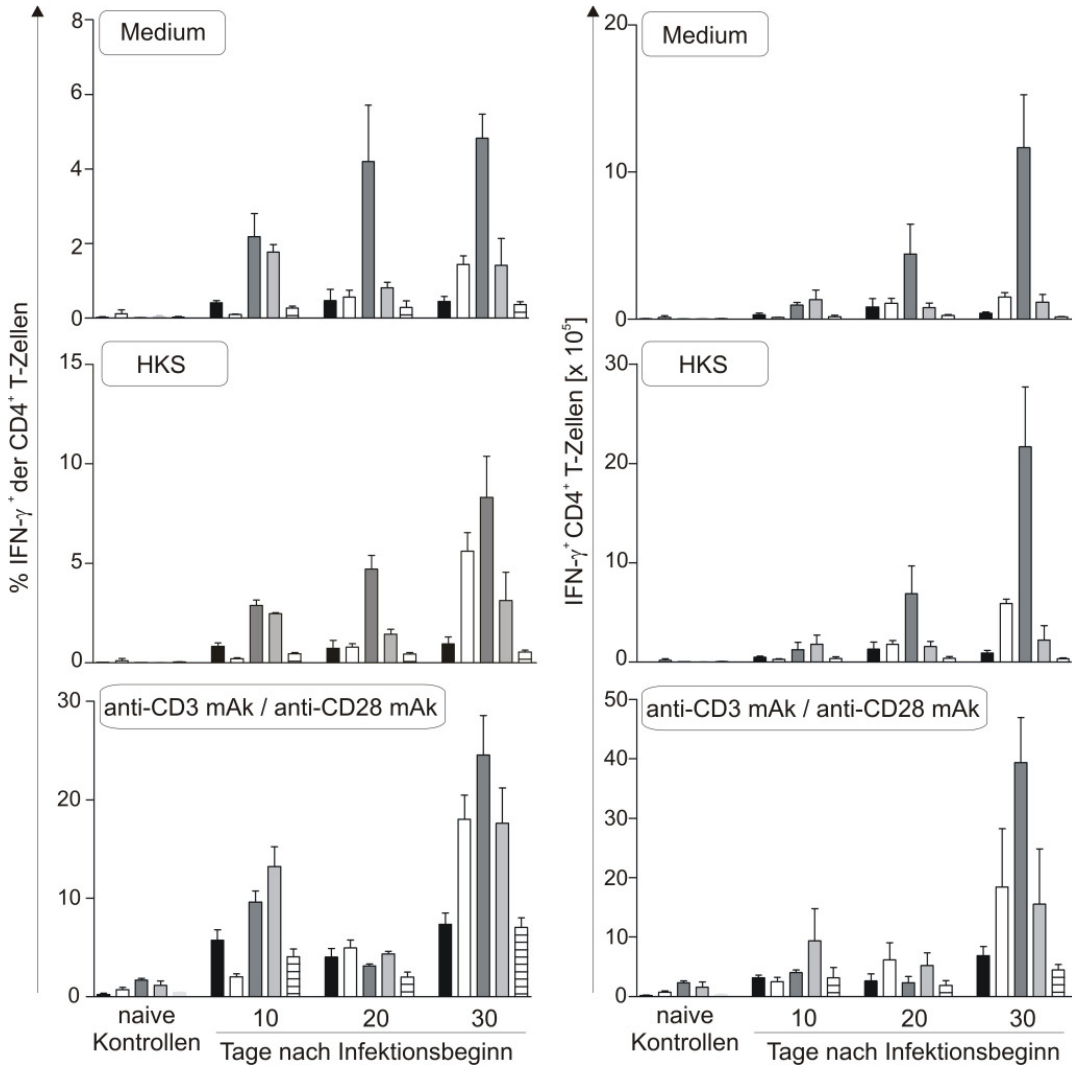

Abb.7 IFN-γ^+ $CD4^+$ T-Zellen nach *S. typhimurium*-Infektion. $MyD88^{-/-}$-Mäuse (weiße Balken), $TLR2+4^{-/-}$-Mäuse (dunkelgraue Balken), $TLR4^{-/-}$-Mäuse (hellgraue Balken), $TLR2^{-/-}$-Mäuse (gestreifte Balken) und C57BL/6-Mäuse (schwarze Balken) wurden mit $5x10^5$ SL7207OVA i.v. infiziert und an den angegebenen Zeitpunkten getötet. Die Milzen wurden entnommen, homogenisiert und mit hitzeinaktivierten *Salmonellen* (HKS) oder CD3 mAk und CD28 mAk restimuliert. Nach 5h wurde die IFN-γ-Produktion der $CD4^+$ T-Zellen durch intrazelluläre Zytokinfärbung am Durchflusszytometer bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 4 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung.

5.1.5 TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse generieren eine humorale Immunantwort nach *S. typhimurium*-Infektion

Die *S. typhimurium*-Infektion induziert neben einer zellvermittelten Immunantwort auch eine starke Antikörperantwort (Brown and Hormaeche, 1989), die eine wichtige Rolle in der Immunität gegen diesen Erreger spielt (Mittrucker *et al.*, 2000b). Die Immunglobulintiter geben Aufschluss über die T-Zellhilfe während der B-Zelldifferenzierung. Die Ausbildung von spezifischen IgG1- und IgG2a/-IgG2b lässt hierbei generelle Aussagen zur T-Zellhilfe zu. Zusätzlich erlaubt das Verhältnis von IgG2a/IgG2b zu IgG1 Rückschlüsse auf die Art der T-Helferdifferenzierung zu ziehen. Eine starke IgG1-Antwort steht hierbei für eine T_H2-Antwort, ein ausgeprägter IgG2a/IgG2b-Titer hingegen verdeutlicht eine T_H1-Antwort.

Wildtyp-Mäuse, TLR2$^{-/-}$-Mäuse, TLR4$^{-/-}$-Mäuse, TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse und MyD88$^{-/-}$-Mäuse wurden mit $5x10^5$ SL7207OVA infiziert und an verschiedenen Zeitpunkten wurde den Mäusen Blut entnommen. Das aus dem Blut gewonnene Serum wurde im ELISA auf *Salmonellen*-spezifische Antikörper hin untersucht. Abb.8 zeigt die Ergebnisse für Tag 10, 20, und 30. Nach Infektion mit *Salmonellen* konnten in allen infizierten Mäusen hohe Titer an *Salmonellen*-spezifischen IgM, IgG1, IgG2a und IgG2b nachgewiesen werden. Im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen zeigten TLR2$^{-/-}$-, TLR4$^{-/-}$- und TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse ähnliche IgM und IgG2b Titer, jedoch leicht erhöhte IgG2a-Titer. Für MyD88$^{-/-}$-Mäuse konnte bereits an Tag 10 nach Infektionsbeginn ein früher IgG1-Titer gemessen werden. Für alle darauffolgenden Zeitpunkte wurde in MyD88-defizienten Mäusen ein erhöhter IgG1-Titer gezeigt (Abb.8). Weiterhin wurden verstärkte IgG1 Titer auch in TLR4$^{-/-}$-Mäusen und TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen nachgewiesen (Abb.8). Hingegen zeigten TLR2$^{-/-}$-Mäuse eine mit den infizierten Kontrollen vergleichbare IgG1-Antwort.

Weder TLR2, TLR4 oder MyD88 waren für die Generierung einer humoralen Immunantwort nach *S. typhimurium*-Infektion notwendig. Der IgG-Isotypenwechsel wurde in allen Mäusen vollzogen und die unveränderten IgG2a- und IgG2b-Titer wiesen auf eine funktionelle T_H1-Antwort hin. Die Abwesenheit insbesondere von MyD88 führte jedoch zu einer, während der gesamten Infektion deutlich verstärkten IgG1-Antwort in diesen Mäusen, die wiederum auf eine zusätzliche T_H2-Antwort schließen ließ.

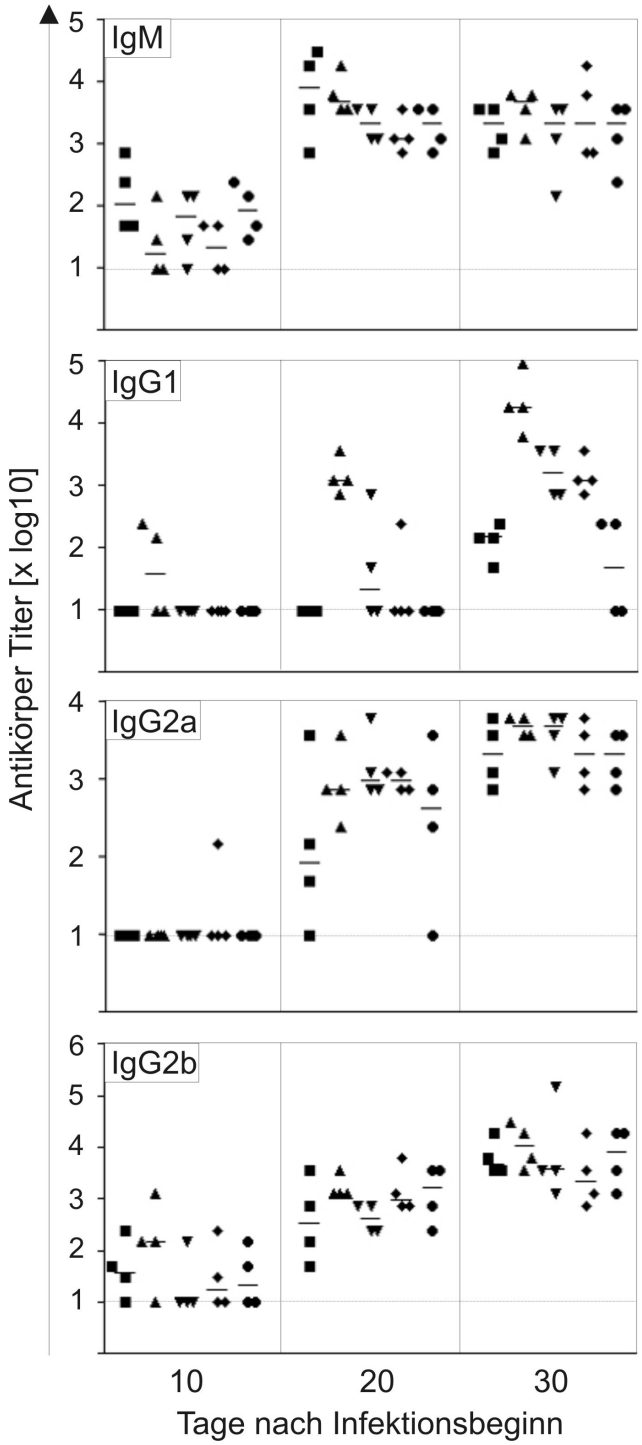

Abb.8 MyD88$^{-/-}$-Mäuse, TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse TLR4$^{-/-}$-Mäuse und TLR2$^{-/-}$-Mäuse generieren *Salmonellen*-spezifische Antikörper. C57BL/6-Mäuse (■), MyD88$^{-/-}$-Mäuse (▲), TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse (▼), TLR4$^{-/-}$-Mäuse (♦) und TLR2$^{-/-}$-Mäuse (●) wurden mit 5x10^5 SL7207OVA i.v. infiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurden die Mäuse geblutet, und *S. typhimurium*-spezifische IgM-, IgG1-, IgG2a- and IgG2b-Antikörper-Titer wurden im Serum durch ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt die Medianwerte von mindestens 4 Mäusen pro Gruppe.

5.1.6 Zytokin- und Chemokin-Genexpression nach *S. typhimurium*-Infektion

Es konnte bisher gezeigt werden, dass nach Infektion mit *S. typhimurium* in TLR2$^{-/-}$-Mäusen, TLR4$^{-/-}$-Mäusen, TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen und MyD88$^{-/-}$-Mäusen T-Zellen sowohl nach Antigenrestimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid oder HKS als auch nach Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk IFN-γ produzieren. Um einen Überblick über die Expression weiterer Zytokine und Chemokine nach Infektion mit *S. typhimurium* zu erhalten, wurde die mRNA-Expression verschiedener Zytokine und inflammatorischer Chemokine untersucht. Hierfür wurden MyD88$^{-/-}$-Mäuse, TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse und C57BL/6-Mäuse mit $5x10^5$ SL7207OVA infiziert und die Milzen an Tag 10 nach Infektionsbeginn entnommen. Nach mRNA Aufreinigung folgte die Analyse der Zytokin- und Chemokinexpression mit Hilfe von quantitativer Reverse Transkriptase PCR (Tabelle 1 und 2).

Naive TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse und Kontroll-Mäuse zeigten ein gleichartiges mRNA Profil. So waren die Expressionsraten der Zytokine IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, und IL-23 ähnlich, TLR2+4-defiziente Mäuse wiesen aber eine erhöhte IFN-β Expression auf. In naiven Wildtyp-Kontrollen konnte im Gegensatz zu naiven TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen, IL-27 nicht gemessen werden. Nach Infektion der C57BL/6-Kontrollen mit SL7207OVA veränderte sich das mRNA Profil dieser Mäuse deutlich. Es wurde eine verstärkte Expression der Zytokine IFN-β, IFN-γ, IL-10 und IL-21, aber eine verminderte Expressionsrate des Zytokins IL-4 beobachtet. TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse zeigten nach Infektion eine ähnliche Veränderung des Expressionsprofils mit allerdings deutlicher verstärkten IFN-β Expression (Tabelle 2). Zusätzlich wiesen TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse eine erhöhte Expression von IL-1α und IL-27 auf.

Naive MyD88$^{-/-}$-Mäuse und naive Kontroll-Mäuse hatten ein vergleichbares mRNA-Expressionsprofil. Nach Infektion mit SL7207OVA wurden jedoch Unterschiede im mRNA-Expressionsprofil zwischen C57BL/6-Mäusen und MyD88-defizienten Mäusen deutlich. Obwohl in MyD88-defizienten Mäusen die verstärkte Expression der Zytokine IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-21 and IL-27 der in C57BL/6-Mäusen ähnelte, zeigten infizierte MyD88$^{-/-}$-Mäuse, im Gegensatz zu den infizierten Kontrollen, zusätzlich eine starke IL-4 Expression (Tabelle 1).

Im Vergleich zu naiven Kontrollen wiesen naive TLR2+4-defiziente Mäuse eine analoge oder leicht verringerte mRNA-Expression der meisten Chemokine auf. Eine Ausnahme bildete hier das Chemokin CCL-7 dessen Expressionsrate in TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen, verglichen mit der in Wildtyp-Kontrollen, deutlich reduziert war. Die zweite Abweichung stellt die Expression von CXCL-11 dar, das wesentlich schwächer in Wildtyp-Kontrollen als in TLR2+4-defizienten Mäusen gebildet wurde. Nach Infektion fand in C57BL/6-Mäusen eine verstärkte Expression der meisten inflammatorischen Chemokine statt. Ausnahmen waren CCL-1, CCL-5, CCL-6, CCL-9 und CXCL-1 deren Expression sich nicht oder nur in geringem Umfang änderte. Nach *Salmonellen*-Infektion wiesen auch TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse eine verstärkte Expression der meisten Chemokine auf. Ausnahmen waren hier CCL-1, CXCL-4 und CXCL-7, deren Expression auf dem Niveau der naiven Kontrollen verblieb. CXCL-11 wurde als einziges Chemokin in infizierten C57BL/6- Mäusen deutlich schwächer exprimiert als in infizierten TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen.

Nach Infektion mit *S. typhimurium* ließen MyD88$^{-/-}$-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäuse große Unterschiede in Milzgewicht und -zellularität erkennen, woraufhin auch mRNA dieser Mäuse hinsichtlich Unterschiede im Expressionsprofil verschiedener inflammatorischer Chemokine untersucht wurde (Tabelle 1 und 2). Naive MyD88$^{-/-}$-Mäuse und naive C57BL/6-Kontrollen zeigten für die meisten Chemokine ein vergleichbares Expressionsprofil. Die Chemokine CXCL-1 und CXCL-2 wurden in naiven MyD88$^{-/-}$-Mäusen in deutlich geringerer Menge exprimiert. Nach Infektion fand auch in MyD88$^{-/-}$-Mäusen eine veränderte Expression vieler Chemokine statt. Verglichen mit infizierten C57BL/6-Mäusen war diese Chemokinexpression jedoch deutlich schwächer ausgeprägt (Tabelle 1). Zusätzlich änderte sich die Expressionsrate von CCL-9, CXCL-1, CXCL-4, CXCL-5 und CXCL-7 in MyD88-defizienten Mäusen, im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen, nach Infektion nur unwesentlich.

C57BL/6-Mäuse, TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse bildeten sowohl eine humorale Immunantwort, als auch eine $OVA_{257-264}$-spezifische IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellantwort, aus. Zusätzlich wurde in allen Mäusen eine IFN-γ^+ $CD4^+$ T-Zellantwort nachgewiesen. Durch quantitative RT-PCR konnte ebenfalls eine verstärkte IFN-γ Genexpression zumindest für Wildtyp-Kontrollen, TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse und MyD88$^{-/-}$-Mäuse nachgewiesen werden. Diese IFN-γ-Produktion konnte

in der quantitativen RT-PCR jedoch nicht einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden.

Tabelle 1. Zytokin- und Chemokin-mRNA-Expression in Milzen von MyD88$^{-/-}$ Mäusen und C57BL/6 Mäusen an Tag 10 nach *S. typhimurium* Infektion

Zytokine oder Chemokine	X-facher Unterschied zur 18S rRNA [x10^3]			
	C57BL/6 naive	MyD88$^{-/-}$ naive	C57BL/6 inf.	MyD88$^{-/-}$ inf.
CCL-1	-5196	-3044	-2877	-3308
CCL-2	-2777	-4380	-406*	-829*
CCL-4	-497	-586	-164*	-173*
CCL-5	-8.4	-8.3	-3.5	-3.6
CCL-6	-10.3	-11.9	-7.6	-8.3
CCL-7	-5026	-10971	-649 *	-1282*
CCL-9	-68	-77	-22*	**-61**
CXCL-1	-3296	-12240	-1796	**-5864** *
CXCL-2	-6236	-17475	-1070*	-1940
CXCL-4	-9.8	-16.0	-2.7 *	**-13.1**
CXCL-5	-181	-243	-29 *	**-156**
CXCL-7	-3.6	-6.0	-1.3 *	**-5.5**
CXCL-9	-17.9	-17.5	-1.6 *	-2.1 *
CXCL-10	-13.9	-19.0	-3.6 *	-4.2 *
CXCL-11	-6629	-3500	-368 *	-334 *
IFN-β	-19160	-18845	-5599*	-11955
IFN-γ	-738	-557	-52 *	-57 *
IL 1-α	-136	-172	-50 *	-83
IL 1-β	-69	-81	-36	-73
IL-4	-5063	-3049	**-11615**	-1034*
IL-6	-2425	-4196	-824 *	-1660*
IL-10	-1604	-1376	-196 *	-288 *
IL-18	-37	-35	-32	-25
IL-21	-2262	-2893	**-393** *	-139 *
IL-23	-11620	-7813	-5525	-6723
IL-27	-854	-905	-106 *	-185 *
TNF-α	-34	-44	-17	-21

Tabelle 1. Zytokin- und Chemokinexpressionsprofil in Milzen von MyD88$^{-/-}$-Mäusen und C57BL/6-Mäusen nach *S. typhimurium*-Infektion. MyD88$^{-/-}$-Mäuse und C57BL/6-Mäuse wurden mit 5x10^5 SL7207OVA infiziert. An Tag 10 nach Infektionsbeginn wurden die Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Nach Aufreinigung der Milzzellen wurde mRNA isoliert und die mRNA aus drei Mäusen wurde vereinigt. Für die Quantifizierung der Zytokin– und Chemokin-mRNA wurde eine quantitative Reverse Transkriptase PCR durchgeführt. Alle hier ermittelten Daten wurden mit den Werten der endogenen 18S rRNA-Kontrolle abgeglichen und repräsentieren den Durchschnittswert von Duplikaten. Die Standardabweichung lag unterhalb von 25% der jeweiligen mRNA Expressionsrate. Höhere Standardabweichungen wurden für CCL-1 (30%), CCL-7 (40%), IL-4 (40%), IL-6 50%) und CXCL-11 (50%) beobachtet. Die Werte der Zytokin-und Chemokinexpression die mit einem Stern (*) markiert wurden, zeigten einen mehr als 2.5-fache Anstieg der Genexpression verglichen mit den naiven Kontrollen. Die unterstrichenen Werte wiesen einen mehr als 2.5-fachen Anstieg der Expression zwischen den infizierten Gruppen auf.

Tabelle 2. Zytokin- und Chemokin-mRNA-Expression in Milzen von TLR2/4$^{-/-}$ Mäusen und C57BL/6 Mäusen an Tag 10 nach *S. typhimurium* Infektion

Zytokine oder Chemokine	X-facher Unterschied zur 18S rRNA [x10^3]			
	C57BL/6 naive	TLR2/4$^{-/-}$ naive	C57BL/6 inf.	TLR2/4$^{-/-}$ inf.
CCL-1	-3113	-6068	-2242	**-6741**
CCL-2	-1216	-2203	-344 *	-285 *
CCL-4	-306	-355	-118 *	-110 *
CCL-5	-8.0	-5.4	-3.6	-3.8
CCL-6	-8.8	-12.5	-8.3	-11.5
CCL-7	-1421	-17462	-412 *	-659 *
CCL-9	-54	-75	-24	-54
CXCL-1	-2509	-2104	-1437	-1557
CXCL-2	-6117	-3546	-790 *	-1600
CXCL-4	-7.3	-8.4	-2.2 *	**-5.9**
CXCL-5	-125	-240	-30 *	-56 *
CXCL-7	-3.6	-7.7	-1.2 *	**-5.5**
CXCL-9	-15.2	-19.2	-1.6 *	-1.8 *
CXCL-10	-9.9	-10.9	-2.9 *	-4.8
CXCL-11	-6760	-2112	**-445** *	-117 *
IFN-β	-7200	-1982 *	**-2276** *	-339 *
IFN-γ	-598	-367	-43 *	-35 *
IL 1-α	-95	-143	-43	-52 *
IL 1-β	-51	-33	-27	-38
IL-4	-2399	-1888	-25427 x	-12965 x
IL-6	-1739	-1759	-768	-1118
IL-10	-1224	-965	-134 *	-137 *
IL-18	-29	-23	-22	-20
IL-21	-1651	-1277	-224 *	-205 *
IL-23	-4024	-7268	-4479	-6255
IL-27	ND	-709	-64	-96 *
TNF-α	-22	-19	-10	-14

Tabelle 2. Zytokin- und Chemokinexpressionsprofil in der Milz von TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen und C57BL/6-Mäusen nach *S. typhimurium*-Infektion. TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse und C57BL/6-Mäuse wurden mit 5x10^5 SL7207OVA infiziert. An Tag 10 nach Infektionsbeginn wurden die Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Nach Aufreinigung der Milzzellen wurde mRNA isoliert und die mRNA aus drei Mäusen wurde vereinigt. Für die Quantifizierung der Zytokin- und Chemokin-mRNA wurde eine quantitative Reverse Transkriptase PCR durchgeführt. Alle hier ermittelten Daten wurden mit den Werten der endogenen 18S rRNA-Kontrolle abgeglichen und repräsentieren den Durchschnittswert von Duplikaten. Die Standardabweichung lag unterhalb von 25% der jeweiligen mRNA Expressionsrate. Höhere Standardabweichungen wurden für IFN-β (35%), IFN-γ (35%), CXCL-2 (58%), IL-4 (50%) beobachtet. Die Werte der Zytokin-und Chemokinexpression die mit einem Stern (*) markiert wurden, zeigten einen mehr als 2.5-fachen Anstieg der Genexpression verglichen mit den naiven Kontrollen. Die unterstrichenen Werte wiesen einen mehr als 2.5-fachen Anstieg der Genespression zwischen den infizierten Gruppen auf. Werte die mit einem Kreuz (x) markiert wurden, zeigten eine mehr als 2.5-fache Reduktion in der Genexpression verglichen mit den naiven Kontrollen.

5.2 Analyse der frühen T-Zellaktivierung nach *Salmonellen*-Infektion in C57BL/6-Mäusen

Die Infektion mit virulenten *S. typhimurium* führt in Mäusen zu einer schweren Entzündung in Milz und Leber, die insbesondere in *Nramp*-1^s Mäusen innerhalb weniger Tage zum Tod der Tiere führt. Im folgenden Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, in wie weit diese schwere Entzündung Phänotyp und Funktion der T-Zellen beeinflusste. Nach einer Infektion von *Nramp*-1^s C57BL/6 mit dem virulenten *Salmonellen*-Stamm SL1344 wurden T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen untersucht. Neben einer phänotypischen Analyse wurde geprüft, ob und wie sich in den CD8$^+$ T-Zellen die Fähigkeit zur Aktivierung oder zur Apoptoseinduktion veränderte. Zusätzlich wurde das unter 4.4.6 beschriebene Zelltransfersystem verwendet. OT-1 CD8$^+$ T-Zellen wurden in Rezipienten transferiert, die eine andere Isoform des Thy1-Moleküls aufwiesen. Die transferierten Zellen waren daher aufgrund ihrer Thy1.2 Markierung von endogenen Thy1.1-positiven T-Zellen einfach zu unterscheiden. Die *Salmonellen*-Infektion nach T-Zelltransfer ermöglichte es die Auswirkung der starken Entzündung auf eine leicht zu detektierende TZR-transgene CD8$^+$ T-Zellpopulation mit bekannter TZR-Spezifität zu untersuchen. Neben der phänotypischen Charakterisierung konnte in dieser T-Zellpopulation in funktionellen Analysen der Einfluss der Entzündung auf eine nachfolgende Antigen-spezifische Aktivierung der T-Zellen untersucht werden.

Als „Positivkontrolle“ diente in diesen Experimenten die Infektion mit *Listeria monozytogenes* OVA (L.m.OVA), die zu einer Aktivierung und Proliferation der transferierten Ovalbumin-spezifischen OT-1 CD8$^+$ T-Zellen führte.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden bereits Versuche durchgeführt um die T-Zellantwort nach einer Infektion mit virulenten Stämmen von *S. typhimurium* zu analysieren. Hierzu wurde der virulente *S. typhimurium*-Stamm SL1344OVA verwendet, der ähnlich wie SL7207OVA das Peptid $OVA_{257-264}$ (SIINFEKL) sezerniert. Nach einer Infektion mit SL1344OVA konnte weder in transferierten OT-1 CD8$^+$ T-Zellen noch in der endogenen CD8$^+$ T-Zellpopulation eine $OVA_{257-264}$-spezifische T-Zellantwort nachgewiesen werden. Die Gründe für das Ausbleiben der spezifischen T-Zellantwort sind unklar, die nähere Charakterisierung dieser Beobachtung war aber nicht Teil dieser Doktorarbeit.

5.2.1 Aktivierung naiver endogener und transferierter CD8$^+$ T-Zellen nach Infektion mit *S. typhimurium*

Milzzellen aus OT-1 Thy1.2$^+$ Mäusen wurden in Thy1.1$^+$ Rezipienten transferiert. Es folgte die i.v. Infektion mit 1x10^3 virulenten *S. typhimurium*-Stamm SL1344 oder 5x10^3 L.m.OVA. An Tag 2 bis 5 nach Infektionsbeginn wurden die Thy1.1$^+$ Rezipienten getötet, und die Milzzellen aufbereitet. Eine nach Infektion beobachtete, moderate Zunahme der Milzzellzahl (Abb.9) konnte nach *Salmonellen*-Infektion nicht auf eine Vergrößerung der CD8$^+$ T-Zellpopulation zurückgeführt werden (Abb.10). Hingegen proliferierten übertragene CD8$^+$ T-Lymphozyten nach Infektion mit L.m.OVA, wie durch eine Zunahme der Anzahl Thy1.2$^+$ CD8$^+$ T-Zellen nachgewiesen wurde (Abb.10). Der Anteil der transferierten T-Zellen stieg auf 30% der gesamten CD8$^+$ T-Zellpopulation bis Tag 5 nach Infektion und erhöhte sich auf über 1x10^6 CD8$^+$ T-Zellen. Im Gegensatz dazu konnte eine Verringerung der Frequenz als auch eine Abnahme der Anzahl transferierter CD8$^+$ T-Zellen nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* nachgewiesen werden. An Tag 5 nach Infektion wurden deutlich geringere OT-1 CD8$^+$ T-Zellzahlen im Vergleich zu naiven Mäusen (Abb. 10) festgestellt. Bezogen auf die endogenen CD8$^+$ T-Zellpopulationen fanden kaum Änderungen in Frequenz und Anzahl der CD8$^+$ T-Zellen nach *Listerien*- als auch *Salmonellen*-Infektion statt (Abb.10).

Im Folgenden wurde der Aktivierungsstatus der endogenen und der transferierten CD8$^+$ T-Zellen nach Infektion mit L.m.OVA bzw. *S. typhimurium* untersucht. CD69 gilt als ein sehr früher Aktivierungsmarker und wird bereits kurz nach Infektion exprimiert. CD62L, oder L-Selektin, ist ein Leukozyten-Adhäsionsmolekül, das naive Lymphozyten exprimieren um in Lymphknoten eindringen zu können. Nach Aktivierung der Lymphozyten stellen diese die Bildung von L-Selektin ein, so dass das Molekül von der Zelloberfläche verschwindet. Die niedrige Oberflächenexpression von CD62L kann daher ebenfalls als Aktivierungsmerkmal für T-Zellen angesehen werden.

An Tag 5 nach *S. typhimurium*-Infektion wurde eine Aktivierung der endogenen CD8$^+$ T-Zellen anhand des frühen Aktivierungsmarkers CD69 festgestellt (Abb.11). Die *Salmonellen*-Infektion induzierte ferner die Aktivierung transferierter CD8$^+$ T-Zellen, wie durch die verstärkte Zunahme CD69-exprimierender CD8$^+$ T-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb.12). Zusätzlich wurde nach *Salmonellen*-

Infektion die Aktivierung der transferierten OT-1 $CD8^+$ T-Zellen anhand einer erhöhten Frequenz an $CD62L^{low}$ $CD8^+$ T-Zellen (Abb.12) gezeigt. Nach L.m.OVA-Infektion konnte eine Aktivierung endogener $CD8^+$ T-Zellen beobachtet werden, wie die CD69-Expression an Tag 4 nach Infektion zeigte (Abb.11). Transferierte $CD8^+$ T-Zellen wurden nach L.m.OVA-Infektion aktiviert, wie anhand der Zunahme der $CD62L^{low}$ $CD8^+$ T-Zellfrequenzen nachgewiesen werden konnte. Die TZR-spezifische Aktivierung transferierter OT-1 $CD8^+$ T-Zellen nach L.m.OVA Infektion bewirkte ausserdem eine Zunahme in der Anzahl aktivierter $CD8^+$ T-Zellen und lässt auf eine Proliferation der transferierten Zellen schließen.

Nach *Salmonellen*-Infektion oder Infektion mit L.m.OVA zeigten endogene $CD8^+$ T-Zellen nur geringe spontane IFN-γ Produktion (Abb.15). Zugleich wiesen endogene $CD8^+$ T-Zellen aus L.m.OVA- oder *Salmonellen*-infizierten Mäusen nach Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid keine Zunahme in Frequenz oder Anzahl IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen auf (Abb.15).

In Abwesenheit einer Infektion mit L.m.OVA oder *S. typhimurium* zeigten 10 bis 15 Prozent der transferierten OT-1 T-Zellen IFN-γ Produktion nach *in-vitro*-Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid. Diese Rate an IFN-γ-Produktion spiegelte wahrscheinlich die Aktivierung von Effektorzellen und Gedächtniszellen innerhalb der OT-1-Population wieder. Nach Transfer von OT-1 Zellen und darauf folgender Infektion mit *S. typhimurium* fand keine weitere Differenzierung zu IFN-γ-produzierenden $CD8^+$ T-Zellen statt, nach *in-vitro*- Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid waren nur wenige OT-1 $CD8^+$ T-Zellen IFN-γ-positiv. Die Frequenz dieser IFN-γ^+ $CD8^+$ OT-1 T-Zellen nahm im Laufe der Infektion sogar ab und fiel an Tag 5 nach Infektion unter die Frequenz IFN-γ produzierender OT-1 $CD8^+$ T-Zellen aus nicht infizierten Tieren.

Im Gegensatz dazu rief die Infektion mit L.m.OVA eine große Zahl IFN-γ produzierender OT-1 T-Zellen hervor, wie nach Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid gezeigt werden konnte.

Im Vergleich zu IFN-γ zeigten transferierte OT-1 $CD8^+$ T-Zellen unabhängig von einer L.m.OVA oder *S. typhimurium*-Infektion deutlich höhere Frequenzen an TNF-α-positiven Zellen nach Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid (Abb. 16). Sowohl nach L.m.OVA-Infektion als auch nach *Salmonellen*-Infektion fanden sich ohne

$OVA_{257-264}$-spezifische Restimulation nur geringe Frequenzen an spontan TNF-α-produzierenden $CD8^+$ OT-1-T-Zellen Jedoch zeigte ein großer prozentualer Anteil der transferierten OT-1 $CD8^+$ T-Zellen sowohl aus L.m.OVA- als auch aus *Salmonellen*-infizierten Mäusen nach *in-vitro* Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid TNF-α-Produktion. Die Rate der nach $OVA_{257-264}$-Restimulation beobachteten TNF-α-Produktion der $CD8^+$ T-Zellen war hierbei von Infektionsbeginn an hoch.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass sowohl nach L.m.OVA-Infektion als auch nach *Salmonellen*-Infektion transferierte OT-1 $CD8^+$ T-Zellen zu TNF-α-Produzenten differenzieren. Hingegen entwickeln sich nur nach L.m.OVA-Infektion OT-1 $CD8^+$ T-Zellen zu IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen.

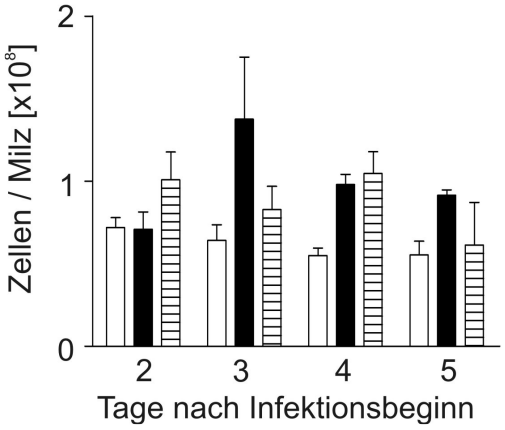

Abb.9 Milzzellzahlen nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* oder L.m.OVA. Nach Transfer von OT-1 $CD8^+$ T-Zellen in C57BL/6-Mäuse fand die Infektion mit $1x10^3$ SL1344 (gestreifte Balken) bzw. $5x10^3$ L.m.OVA (schwarze Balken) statt. An den angegebenen Zeitpunkten nach Infektionsbeginn wurden die Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Nach Aufreinigung wurden die Milzzellen gezählt. Hierbei dienten naive C57BL/6-Mäuse (weiße Balken) als Kontrollen. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 4 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung.

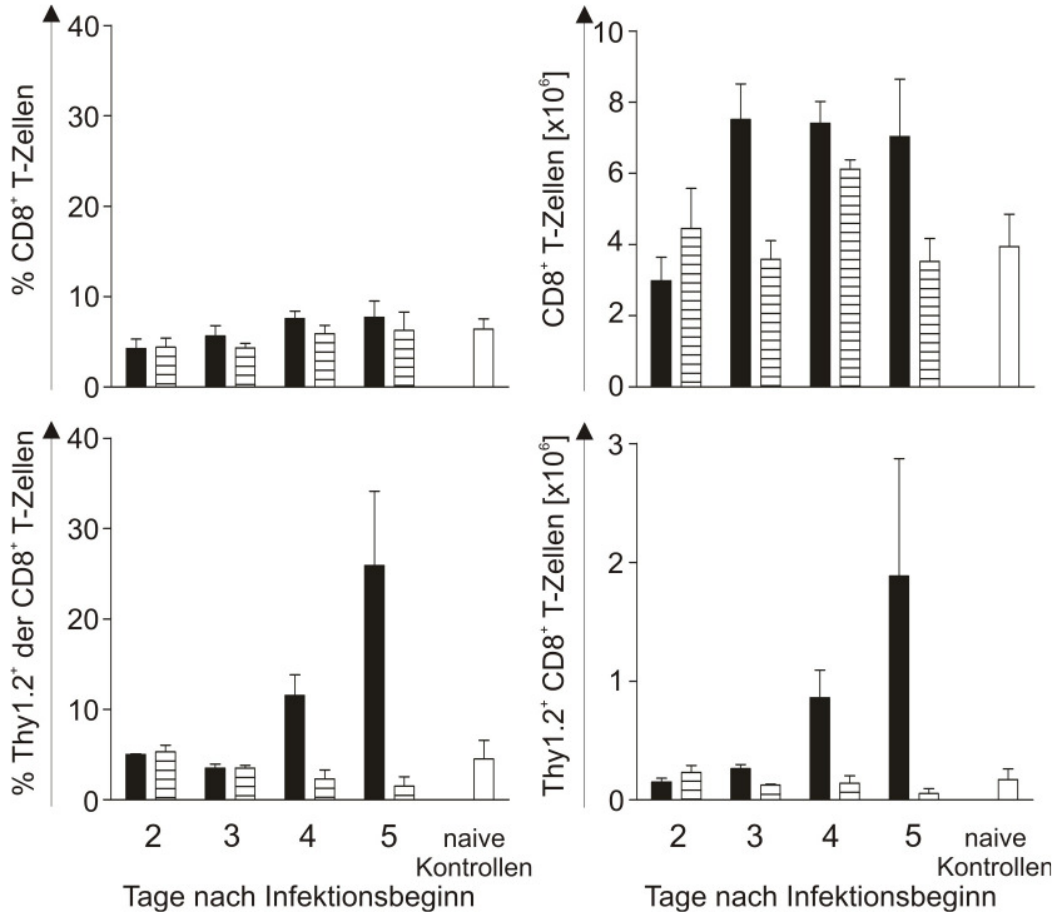

Abb.10 Frequenz und Anzahl endogener und transferierter $CD8^+$ T-Zellen nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* oder L.m.OVA. Nach Transfer von OT-1 Zellen in C57BL/6-Mäusen fand die Infektion mit $1x10^3$ SL1344 (gestreifte Balken) oder $5x10^3$ L.m.OVA (schwarze Balken) statt. Die Mäuse wurden an den angegebenen Zeitpunkten getötet. Es wurden die Milzen entnommen, die Milzzellen aufgereinigt und mit Fluorochrom-gekoppelten CD8 mAk und Thy1.2 mAk gefärbt. Als Kontrolle dienten naive C57BL/6-Mäuse (weiße Balken). Die Analyse fand am Durchflusszytometer statt. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 4 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung.

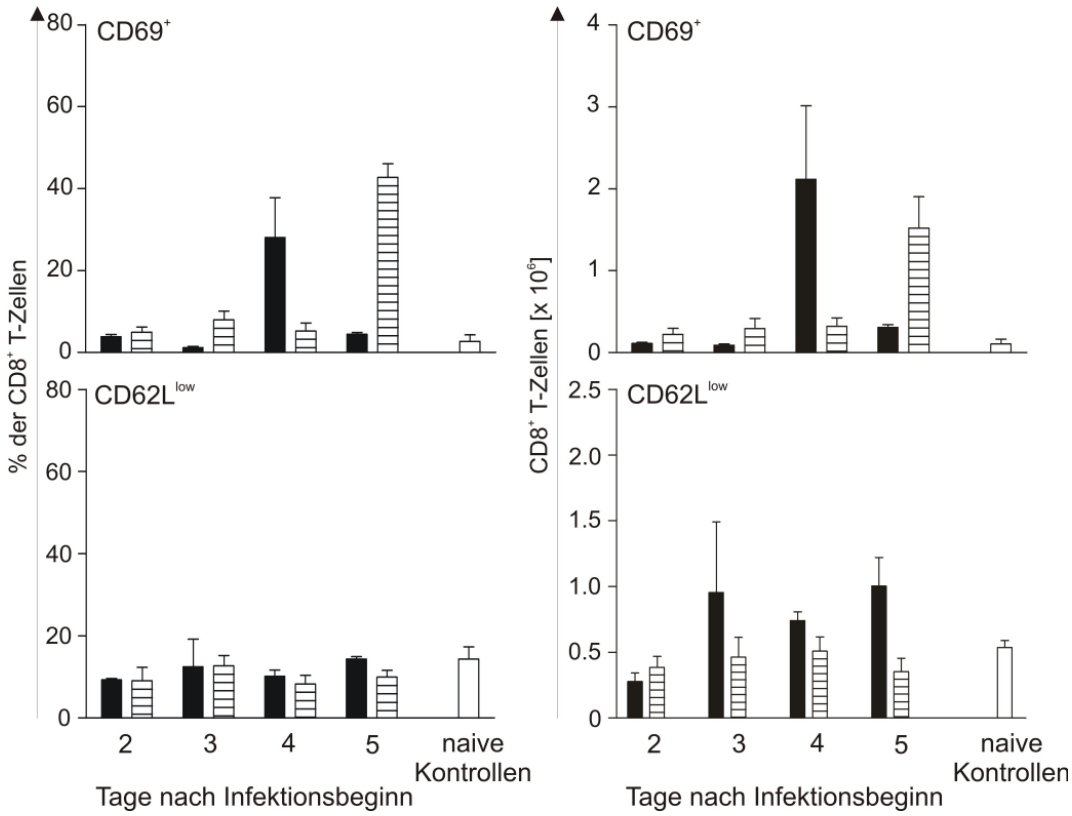

Abb. 11 Frequenz und Anzahl endogener $CD8^+$ T-Zellen nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* oder L.m.OVA. Nach Infektion von C57BL/6-Mäusen mit $1x10^3$ SL1344 (gestreifte Balken) bzw. $5x10^3$ L.m.OVA (schwarze Balken) wurden die Mäuse an den angegebenen Zeitpunkten getötet. Nach Aufreinigung der Milzzellen wurden diese mit Fluorochrom-gekoppelten CD8 mAk und CD62L mAk oder CD69 mAk gefärbt. Naive C57BL/6-Mäuse dienten hierbei als Kontrollen (weiße Balken). Die Analyse fand am Durchflusszytometer statt. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 4 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung.

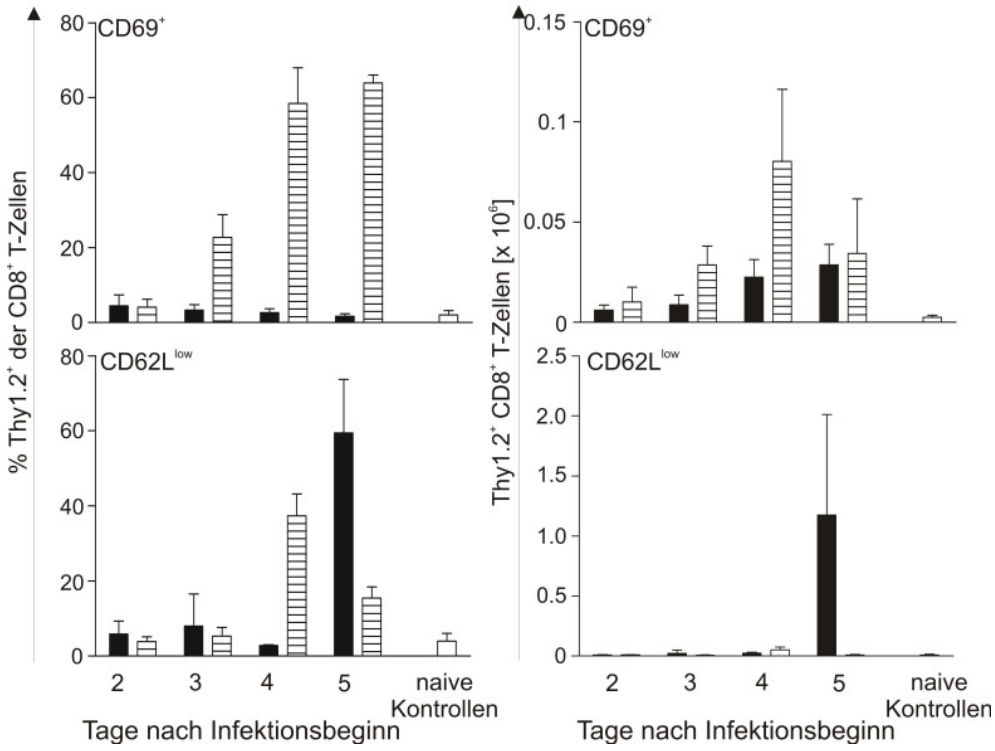

Abb. 12 Frequenz und Anzahl transferierter $CD8^+$ T-Zellen nach Infektion mit *S. typhimurium* oder L.m.OVA. Nach Transfer von OT-1 Zellen in C57BL/6-Mäuse fand die Infektion der Mäuse mit $1x10^3$ SL1344 (gestreifte Balken) bzw. $5x10^3$ L.m.OVA (schwarze Balken) statt. Die Mäuse wurden an den angegebenen Zeitpunkten getötet. Nach Aufreinigung der Milzzellen wurden diese mit Fluorochrom-gekoppelten CD8 mAk, Thy1.2 mAk und CD62L mAk oder CD69 mAk gefärbt. Naive C57BL/6-Mäuse dienten hierbei als Kontrollen (weiße Balken). Die Analyse fand am Durchflusszytometer statt. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 4 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung.

5.2.2 Analyse potentieller Mediatoren der TZR-unspezifischen CD8$^+$ T-Zellaktivierung nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium*.

Wir sehen in der frühen Immunantwort nach *Salmonellen*-Infektion, dass CD8$^+$ T-Zellen unabhängig von ihrer TZR-Spezifität einen aktivierten Phänotyp erwerben. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, wie diese Aktivierung vermittelt wurde. LPS induziert als Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien nach Bindung an TLR4 eine starke T-Zellaktivierung (Castro *et al.*, 1998;Tough *et al.*, 1997). Um die Rolle von LPS und anderer TLR-Liganden in unserem Infektionsmodell zu testen wurden TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse und MyD88$^{-/-}$-Mäuse mit virulenten *S. typhimurium* infiziert. Darüber hinaus wurden auch IFN-γ-Rezeptor-defiziente Mäuse untersucht, da gezeigt werden konnte, dass IFN-γ früh nach Infektion in großen Mengen sezerniert wird und darüber hinaus ein wichtiges Signal der T-Zelldifferenzierung darstellt.

TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse, MyD88$^{-/-}$-Mäuse, IFN-γ-Rezeptor$^{-/-}$-Mäuse und C57BL/6-Kontrollen wurden mit 1x10^3 SL1344 i.v. infiziert. An Tag 5 nach Infektion wurde die Frequenz der CD69$^+$ und der CD62L^{low} CD8$^+$ T-Zellen in der Milz untersucht (Abb. 13). Die L-Selektin-Färbung ergab unwesentliche Unterschiede zwischen den infizierten Gruppen. CD8$^+$ und CD4$^+$ T-Zellen aus TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen zeigten nach Infektion eine etwas geringere CD62L-Expression als die jeweiligen naiven Kontrollen. Nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* wiesen MyD88$^{-/-}$-Mäuse im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen ebenfalls weniger CD62L^{low} CD8$^+$ T-Zellen auf. Die Anzahl an CD62L^{low} CD4$^+$ T-Zellen blieb hingegen gleich.

Im Gegensatz zu den geringen Veränderungen der CD62L-Expression zeigten nach *Salmonellen*-Infektion die T-Zellpopulationen sämtlicher Mäuse eine starke CD69-Expression. Eine Ausnahme bildeten die IFN-γ-Rezeptor$^{-/-}$-Mäuse, hier wiesen CD4$^+$ T-Zellen eine, im Vergleich zur infizierten Kontrolle, etwas reduzierte CD69$^+$-Expression auf.

Insgesamt zeigten diese Ergebnisse aber, dass die frühe Aktivierung der CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen nach Infektion mit *S. typhimurium* weitgehend unabhängig von TLR2+4, dem zentralen TLR-Adapter MyD88 und dem inflammatorischen Zytokin IFN-γ verlief.

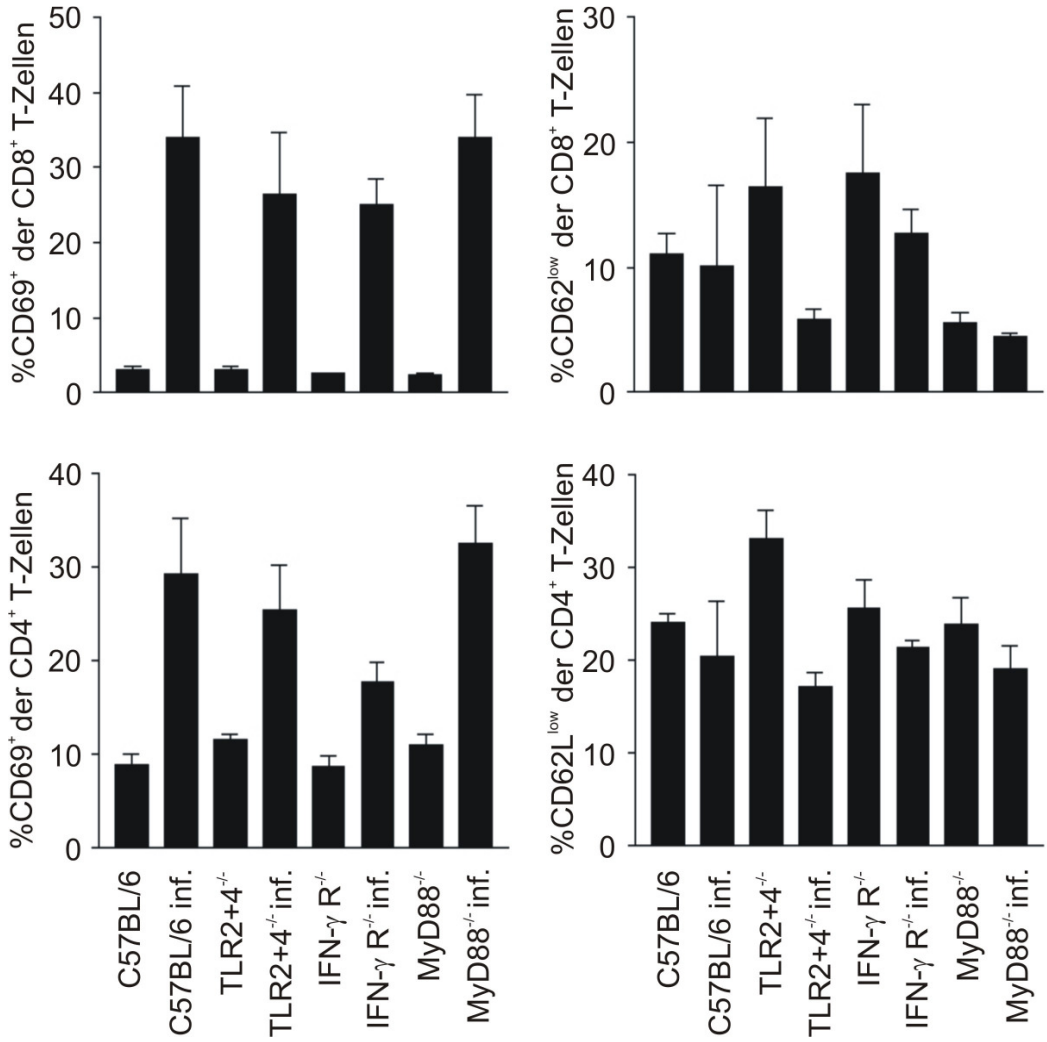

Abb. 13 Frequenz aktivierter $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium*. Nach Infektion von C57BL/6-Mäusen, $MyD88^{-/-}$-Mäusen, $TLR2+4^{-/-}$-Mäusen und IFN-$\gamma R^{-/-}$-Mäusen mit $1x10^3$ SL1344 wurden die Mäuse an Tag 5 nach Infektion getötet. Die Milzzellen wurden mit Fluorochrom-gekoppelten CD8 mAk, CD4 mAk und CD62L mAk oder CD69 mAk gefärbt. Die Analyse wurde am Durchflusszytometer durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 4 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung.

5.2.3 Apoptose-Induktion in transferierten und endogenen T-Zellen nach Infektion mit virulenten *Salmonellen*

Führt die frühe Aktivierung der T-Zellen zu einer erhöhten Sterberate der T-Zellen? Um die Frage zu beantworten, wurde die Rate an programmiertem Zelltod (Apoptose) nach adoptivem Transfer von Thy1.2$^+$ OT-1 Milzzellen in Thy1.1$^+$ C57BL/6-Rezipienten und anschließender i.v. Infektion mit 1x10^3 SL1344, 1x10^3 SL1344OVA oder 5x10^3 L.m.OVA ermittelt. Als Positivkontrolle wurde eine Inkubation der T-Zellen mit einem agonistischem Fas-mAk durchgeführt. Dieser Ak bindet und aktiviert den FAS-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen und verursacht eine Apoptose der Zellen.

Als ein frühes Zeichen von Apoptose gilt der Verlust der Membranintegrität und der damit verbundene Wechsel von Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Zellmembranseite. Phosphatidylserin ist somit der Bindung durch Annexin-V zugänglich und apoptotische Zellen können mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppeltem Annexin-V im Durchflusszytometer nachgewiesen werden.

Da auch bei nekrotischen Zellen aufgrund der permeabilisierten Membran Annexin-V binden kann, wurde gleichzeitig eine Ausschlussfärbung mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) durchgeführt. In nekrotischen Zellen ist im Gegensatz zu apoptotischen Zellen eine Anfärbung der DNA mit dem in die DNA interkalierenden Farbstoff 7-AAD möglich. Im Durchflusszytometer können alle Annexin-V-positiven und zugleich 7-AAD-postiven Zellen als nekrotische Zellen aussortiert werden.

In-vivo werden nach Apoptose die sterbenden Zellen und ihre Zellbestandteile innerhalb kurzer Zeit aus dem Gewebe entfernt. Es sind daher, im Gegensatz zur *in-vitro* Behandlung der Zellen mit FAS mAk, nur geringe Frequenzen Annexin-V-positiver Zellen im Durchflusszytometer zu erwarten.

Die TZR-unabhängig, im Rahmen der Entzündung aktivierten, endogenen CD8$^+$ T-Zellen wurden wie in Abb. 14 gezeigt, sowohl nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* als auch nach L.m.OVA-Infektion apoptotisch. In der hier durchgeführten Messung waren 6 Prozent aller endogenen CD8$^+$ T-Zellen nach *S. typhimurium*-Infektion oder L.m.OVA-Infektion apoptotisch. Die Rate an programmierten Zelltod nach SL1344- oder SL1344OVA-Infektion entsprach dabei der dreifachen Apoptoserate in naiven Kontrollen (Abb.14). Auch in den transferierten OT-1 CD8$^+$ T-Zellen konnte nach einer Infektion mit SL1344 aber

auch mit SL1344OVA eine erhöhte Sterberate nachgewiesen werden, die etwa der der endogenen $CD8^+$ T-Zellen entsprach.

Dahingegen wurden nach L.m.OVA-Infektion deutlich weniger transferierte $CD8^+$ T Zellen apoptotisch als nach *S. typhimurium*-Infektion. Das bedeutet, dass nur die TZR-spezifische Aktivierung der OT-1 $CD8^+$ T-Zellen eine verringerte Apoptoserate zur Folge hatte.

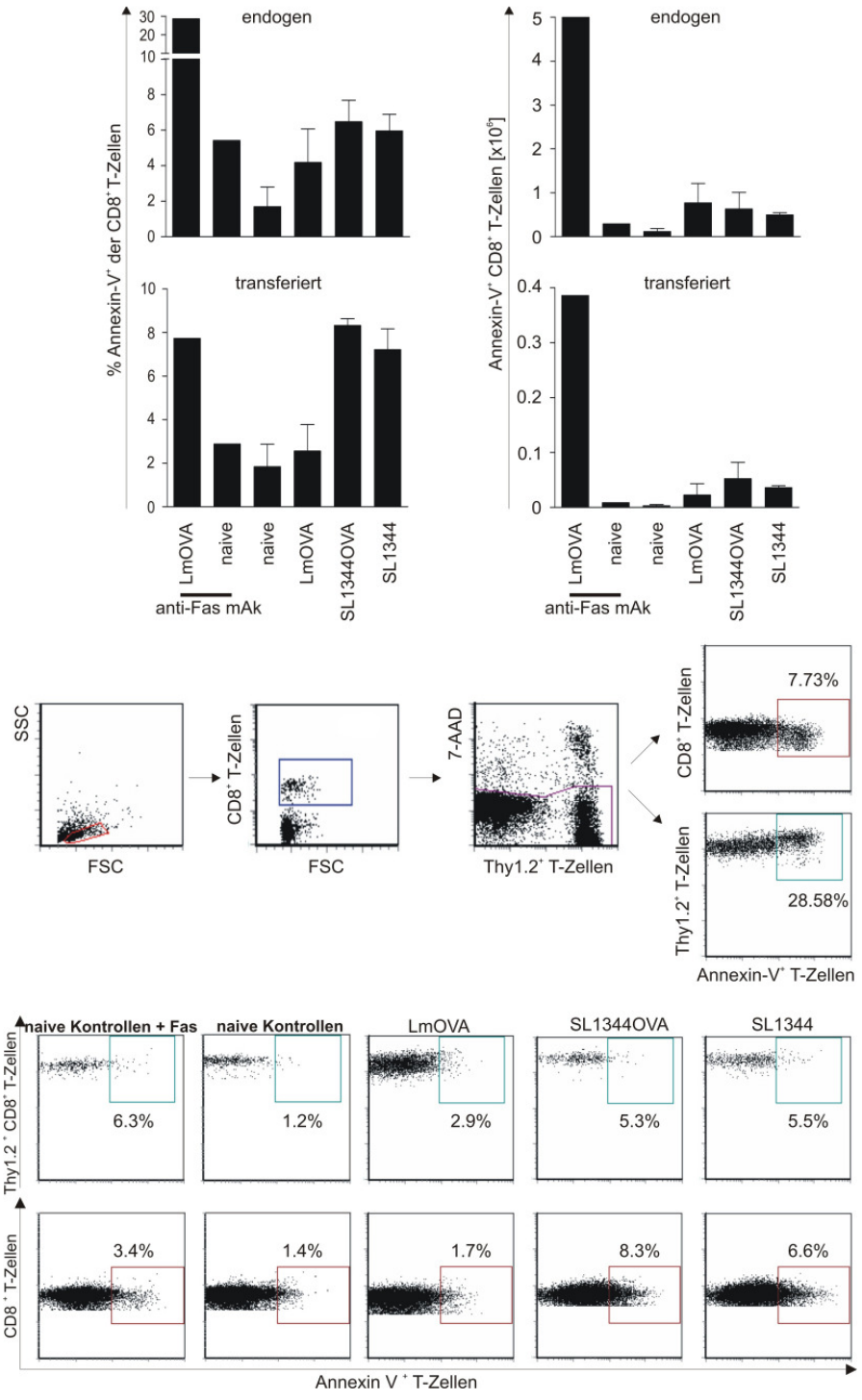

Abb. 14 Frequenz und Anzahl Annexin-V$^+$ CD8$^+$ T-Zellen nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* oder *L. monocytogenes*. Nach Infektion von C57BL/6-Mäusen mit 1x10^3 SL1344, 1x10^3 SL1344OVA oder 5x10^3 L.m.OVA wurden die Mäuse an Tag 4 nach Infektion getötet. Es wurden die Milzen entnommen, die Milzzellen aufgereinigt und mit Fluorochrom-gekoppelten CD8 mAk, Thy1.2 mAk und Annexin-V gefärbt. Die Analyse wurde am Durchflusszytometer durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 4 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung.

5.2.4 Zytokinsekretion nach Infektion mit virulenten *Salmonellen*

Für die Analyse der Zytokinsekretion aktivierter T-Zellen wurde eine intrazelluläre Zytokinmessung durchgeführt. Untersucht wurde die Fähigkeit sowohl transferierter als auch endogener $CD8^+$ T-Zellen IFN-γ und TNF-α zu sezernieren. Nach Transfer von OT-1 $CD8^+$ T-Zellen und anschließender Infektion der Tiere mit $5x10^3$ L.m.OVA, bzw. $1x10^3$ SL1344, wurden an Tag 2 bis 5 nach Infektionsbeginn Milzzellen aufgereinigt und für 4 Stunden *in-vitro* mit oder ohne $OVA_{257-264}$-Peptid inkubiert. Nach Färbung mit CD8 mAk und Thy1.2 mAk in Kombination mit IFN-γ mAk oder TNF-α mAk konnten die Zellen durchflusszytometrisch untersucht werden.

Nach *Salmonellen*-Infektion oder Infektion mit L.m.OVA zeigten endogene $CD8^+$ T-Zellen nur geringe IFN-γ Produktion (Abb.15). Zugleich wiesen endogene $CD8^+$ T-Zellen aus L.m.OVA- oder *Salmonellen*-infizierten Mäusen nach Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid keine Zunahme in Frequenz oder Anzahl IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen auf (Ab.15).

In Abwesenheit einer Infektion mit L.m.OVA oder *S. typhimurium* zeigten 10 bis 15 Prozent der transferierten OT-1 T-Zellen IFN-γ Produktion nach *in-vitro*-Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid. Diese Rate an IFN-γ-Produktion spiegelte offensichtlich die Aktivierung von Effektorzellen und Gedächtniszellen innerhalb der OT-1-Population wieder. Endogene $CD8^+$ T-Zellen differenzierten weder nach L.m.OVA noch nach *Salmonellen*-Infektion zu IFN-γ-sezernierenden $CD8^+$ T-Zellen. Nach Transfer von OT-1 Zellen und darauf folgender Infektion mit *S. typhimurium* differenzierten nach *in-vitro*- Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid nur wenige Zellen zu IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen. Die Frequenz dieser transferierten $CD8^+$ T-Zellen die nach Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid IFN-γ sezernierten, nahm im Laufe der Infektion noch weiter ab und fiel an Tag 5 nach Infektion sogar unter die Frequenz IFN-γ produzierender OT-1 $CD8^+$ T-Zellen aus nicht infizierten Tieren.

Im Gegensatz dazu rief die Infektion mit L.m.OVA eine große Zahl IFN-γ produzierender OT-1 T-Zellen hervor, wie nach Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid gezeigt werden konnte.

Endogene $CD8^+$ T-Zellen differenzierten weder nach L.m.OVA noch nach *Salmonellen*-Infektion zu TNF-α-sezernierenden $CD8^+$ T-Zellen. Ebenso zeigten

endogene $CD8^+$ T-Zellen aus L.m.OVA- oder *Salmonellen*-infizierten Mäusen nach Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid kaum TNF-α-Produktion (Ab.16).
OT-1 T-Zellen sezernierten sowohl nach L.m.OVA-Infektion als auch nach *Salmonellen*-Infektion ohne $OVA_{257-264}$-spezifische Restimulation nur geringe Mengen an TNF-α. Jedoch zeigte ein großer prozentualer Anteil der transferierten OT-1 $CD8^+$ T-Zellen sowohl aus L.m.OVA- als auch aus *Salmonellen*-infizierten Mäusen nach *in-vitro* Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid TNF-α-Produktion.
Die Rate der nach $OVA_{257-264}$-Restimulation beobachteten TNF-α-Produktion der $CD8^+$ T-Zellen war hierbei von Infektionsbeginn an hoch.
Weiterhin konnte gezeigt werden, dass transferierte OT-1 $CD8^+$ T-Zellen auch unabhängig einer L.m.OVA oder *S. typhimurium*-Infektion TNF-α produzieren konnten, wie die Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid zeigte (Abb. 16).

Sowohl nach L.m.OVA-Infektion als auch nach *Salmonellen*-Infektion zeigten transferierte OT-1 $CD8^+$ T-Zellen TNF-α-Produktion nach *in-vitro*-Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid. Hingegen differenzierten nur nach L.m.OVA-Infektion OT-1 $CD8^+$ T-Zellen zu IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen.

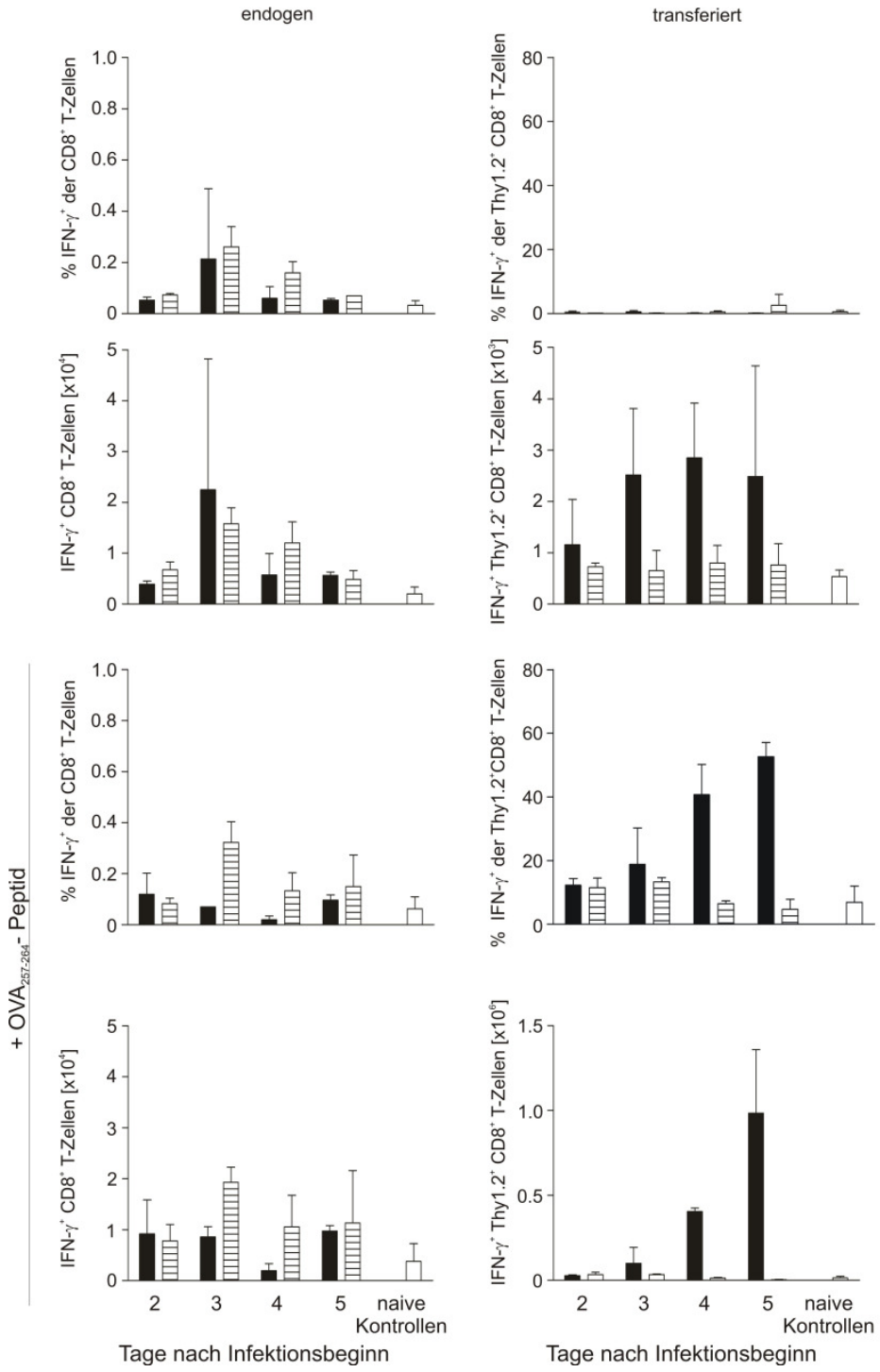

Abb. 15 IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen nach Infektion mit virluenten *S. typhimurium* oder *L. monocytogenes*. Nach adoptivem Transfer von Milzzellen aus TZR-transgenen Thy1.2^+ OT-1 Mäusen in Thy1.1^+ Rezipienten und Infektion mit $1x10^3$ SL1344 (gestreifte Balken) oder $5x10^3$ L.m.OVA (schwarze Balken), wurden die Mäuse an den angegebenen Tagen nach Infektionsbeginn getötet und die Milzen entnommen. Hierbei dienten nicht-infizierte Mäuse (weiße Balken) als Kontrollen. Nach Aufreinigung der Milzzellen fand für 4 Stunden eine *in-vitro*-Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid statt. Nach Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten CD8 mAk, Thy1.2 mAk und IFN-γ mAk wurde die Analyse am Durchflusszytometer durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 4 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung.

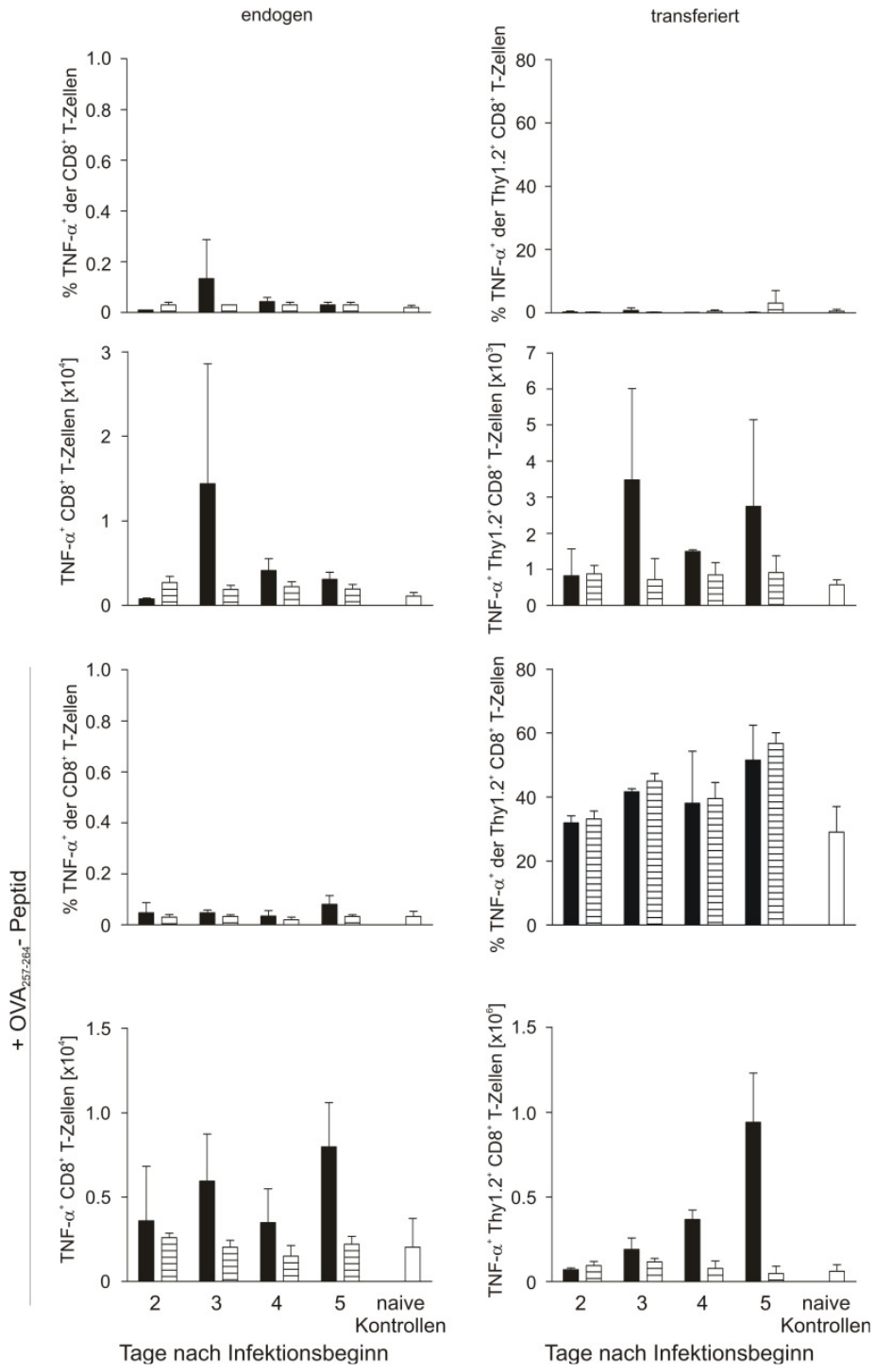

Abb.16 TNF-α^+ $CD8^+$ T-Zellen nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* oder *L. monocytogenes*. Nach adoptivem Transfer von Milzzellen aus TZR-transgenen Thy1.2$^+$ OT-1 Mäusen in Thy1.1$^+$ Rezipienten und Infektion mit $1x10^3$ SL1344 (gestreifte Balken) oder $5x10^3$ L.m.OVA (schwarze Balken), wurden die Mäuse an den angegebenen Tagen nach Infektionsbeginn getötet und die Milzen entnommen. Hierbei dienten nicht-infizierte Mäuse (weiße Balken) als Kontrollen. Nach Aufreinigung der Milzzellen fand für 4 Stunden eine *in-vitro*-Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid statt. Nach Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten CD8 mAk, Thy1.2 mAk und TNF-α mAk wurde die Analyse am Durchflusszytometer durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 4 Mäuse pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung

5.2.5 *S. typhimurium* induziert nach Infektion eine Immunsuppression

Die Infektion mit attenuierten *S. typhimurium* kann eine generelle Immunsuppression auslösen, die u.a. durch Stickstoffmonoxid (NO) (MacFarlane *et al.*, 1999) aber auch durch TGF-β, IL-10, oder Prostaglandine vermittelt werden kann. Um zu untersuchen, ob virulente *Salmonellen* nach Infektion eine Unterdrückung der spezifischen T-Zellantwort auslösen können, wurde ein *in-vivo*-Proliferationstest durchgeführt. Hierfür fand eine Aufreinigung TZR-transgener, Thy1.2$^+$ CD8$^+$ T-Zellen mit Hilfe von Micro-Bead-gekoppelten CD8 mAk und MACS-Technik aus Milzen von OT-1-Mäusen, statt. Nach anschließender CFSE-Markierung wurden diese CD8$^+$ T-Zellen adoptiv in Thy1.1$^+$ Rezipienten transferiert. Es folgte eine Infektion der Rezipienten mit 1x10^3 SL1344. Am nächsten Tag wurde den Mäusen in 100µl inkompletten Freundschen Adjuvans gelöstes SIINFEKL-Peptid subkutan injiziert. An Tag 4 nach *Salmonellen*-Infektion wurden die Mäuse getötet, die Milzen entnommen und die Proliferation der transferierten CD8$^+$ T-Zellen im Durchflusszytometer untersucht.

Nach Transfer $OVA_{257-264}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen und $OVA_{257-264}$-Peptid (SIINFEKL) Injektion konnte eine starke Proliferation der CD8$^+$ T-Zellen beobachtet werden. Diese wurde durch die deutliche Abnahme der CFSE-Fluoreszenz und die Vergrößerung der Thy1.2$^+$ T-Zellpopulation gezeigt. Es erfolgte keine Proliferation der transferierten CD8$^+$ T-Zellen, wenn die Tiere nach dem Transfer mit virulenten *Salmonellen* infiziert wurden. Hier war keine Reduktion der CFSE-Fluoreszenz zu erkennen. Nach Kombination von *Salmonellen*-Infektion und Injektion von SIINFEKL-Peptid zeigten transferierte CD8$^+$ T-Zellen keine Vermehrung der T-Zellen. Jedoch verlief diese Proliferation nach *S. typhimurium*-Infektion deutlich schwächer als nach Restimulation mit Peptid alleine, wie die weniger stark ausgeprägte Reduktion der CFSE-Fluoreszenz zeigte. Wie in Abb. 17 erkennbar, führte die Behandlung mit SIINFEKL-Peptid zur Vergrößerung der Thy1.2$^+$ CD8$^+$ T-Zellpopulation. Hingegen verhinderte die zusätzliche Infektion mit SL1344 die Vergrößerung dieser T-Zellpopulation. Die Proliferation der CD8$^+$ T-Zellen wurde nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* trotz des spezifischen Stimulus deutlich gehemmt, aber nicht vollkommen unterdrückt.

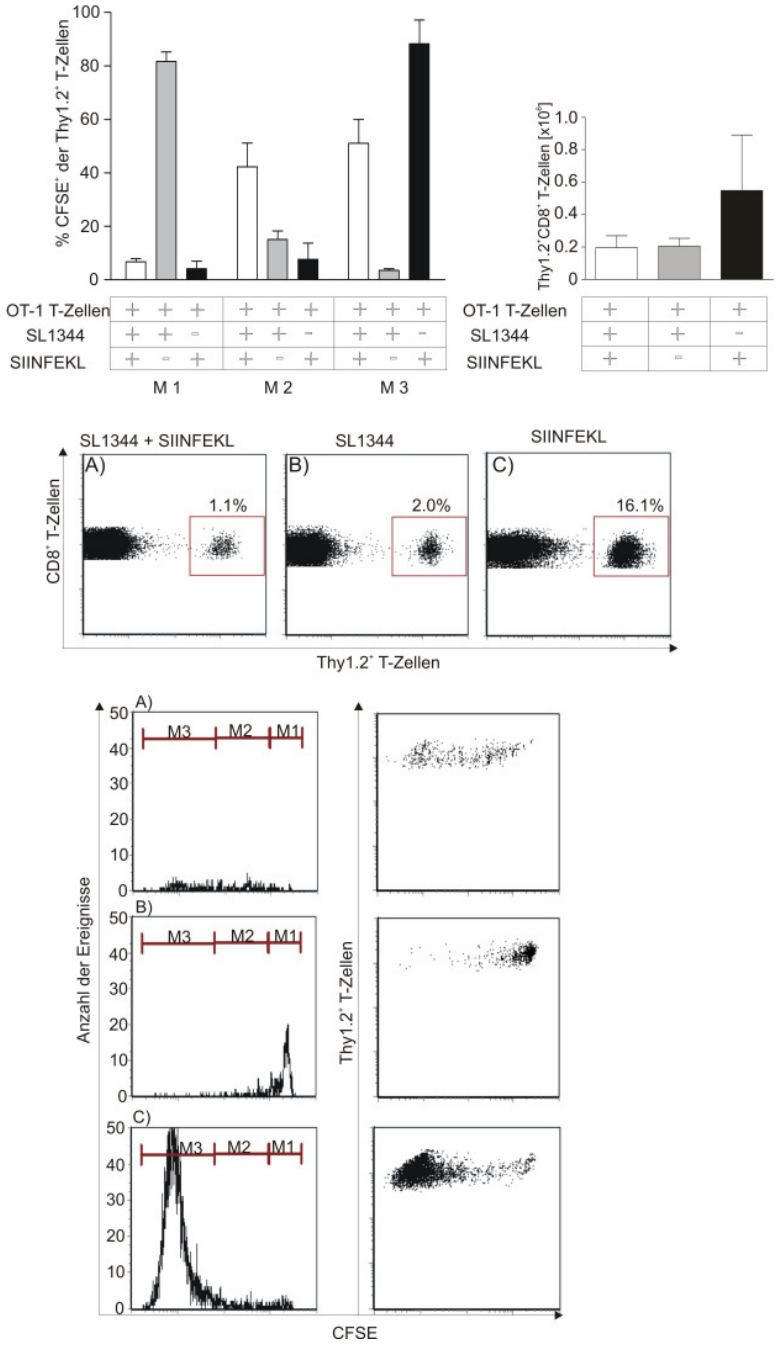

Abb.17 *In-vivo*-Proliferations-Test nach *S. typhimurium*-Infektion. Nach adoptivem Transfer TZR-transgener Thy1.2$^+$ CD8$^+$ T-Zellen in Thy1.1$^+$ C57BL/6-Rezipienten, wurden diese mit 1x10^3 SL1344 i.v. infiziert und z. T. zusätzlich subkutan mit in inkompletten Freundschen Adjuvans gelöstem SIINFEKL-Peptid (3 µg) behandelt. An Tag 4 nach Infektion wurden die Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Nach Aufreinigung der Milzzellen fand eine Färbung mit Fluorochrom-gekoppeltem CD8 mAk und Thy1.2 mAk statt. Die Zellen wurden daraufhin am Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 3 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt und die Standardabweichung.

6 Diskussion

6.1 TLR-unabhängige, erworbene Immunantwort nach *S. typhimurium*-Infektion

Nach Infektion mit virulenten *Salmonellen* sind TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse deutlich empfindlicher und sterben früher als C57BL/6-Mäuse (Weiss *et al.*, 2004). Aufgrund des *Nramp*-1^s Genotyps ist es nicht möglich die erworbene Immunantwort in C57BL/6-Mäusen, TLR2+4-, TLR2-, TLR4- und MyD88-defizienten Mäusen nach Infektion mit virulenten *Salmonellen*, zu untersuchen. Daher wurde die Infektion der Mäuse mit dem *aro*A$^-$-*S. typhimurium*-Stamm SL7207OVA durchgeführt. Die Defizienz des *aro*A-Gens führt zum Verlust eines Enzyms im Biosyntheseweg von Aromaten. *Aro*A$^-$-*Salmonellen* sind daher von der Versorgung mit Aromaten durch den Zellstoffwechsel des Wirtes abhängig, was zu einer deutlichen Attenuation der *aro*A$^-$-*Salmonellen* führt. Auch nach Infektion mit *aro*A$^-$-*Salmonellen* war eine höhere Empfindlichkeit der TLR4-, TLR2-, TLR2+4- und MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen erkennbar. Das äußerte sich zum einen in den höheren Bakterientitern und zum anderen in der verzögerten Eliminierung der Bakterien, die bei TLR2+4- und MyD88-defizienten Mäusen wesentlich später als bei Wildtyp-Kontrollen stattfand. Auch die Splenomegalie war in TLR2+4-defizienten-, TLR4-defizienten und MyD88-defizienten Mäusen von längerer Dauer als in C57BL/6-Mäusen.

In Wildtyp-Kontrollen führte die Infektion mit *aro*A$^-$-*Salmonellen* zu einer starken Entzündung, die besonders an Tag 10 nach Infektion durch die stark ausgeprägte Splenomegalie und die Expression inflammatorischer Chemokine gekennzeichnet war. C57BL/6-Mäuse konnten aber die Vermehrung der *Salmonellen* kontrollieren und diese letztendlich auch eliminieren. Die Infektion führte zur Generierung einer $CD4^+$ T_H1-Antwort, die sich auch in den *Salmonellen*-spezifischen IgG2a- und IgG2b-Titern widerspiegelte. Schließlich konnten in den C57BL/6-Mäusen nach Infektion mit SL7207OVA eine $OVA_{257-264}$-spezifische IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellantwort gezeigt werden. Die Immunantworten nach *Salmonellen*-Infektion in TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defizienten Mäusen wiesen in den meisten untersuchten Parametern deutliche Unterschiede zur Antwort in Wildtyp-Mäusen auf. TLR2-

defiziente Mäuse hingegen zeigten nach Infektion mit SL7207OVA einen reduzierten Bakterientiter und eine von Infektionsbeginn an schwächer ausgeprägte Splenomegalie. In Bezug auf die $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellantwort, sowie die Antikörperproduktion glichen sich jedoch die Immunantworten in TLR2-defizienten Mäusen und Wildtyp-Kontrollen.

$MyD88^{-/-}$-Mäuse zeigten im Vergleich zu allen anderen Mausstämmen die stärkste bakterielle Last während der gesamten Infektion. Hingegen war die Entwicklung der Splenomegalie in diesen Mäusen deutlich verzögert. Der bakterielle Titer ging zumindest zu Beginn der Infektion nicht mit einer Splenomegalie einher. Auch das Chemokinprofil der Milz wies nach *Salmonellen*-Infektion deutliche Unterschiede zwischen MyD88-defizienten und C57BL/6-Mäusen auf. So wurden in MyD88-defizienten Mäusen an Tag 10 nach *Salmonellen*-Infektion inflammatorische Chemokine in vielen Fällen deutlich schwächer gebildet als in Wildtyp-Kontrollen. Trotz dieser deutlichen Unterschiede konnten MyD88-defiziente Mäuse aber wie C57BL/6-Mäuse IFN-γ^+ $CD4^+$ und IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen generieren.

TLR2+4-defiziente Mäuse hatten von Infektionsbeginn an höhere Bakterientiter, eine stärker ausgeprägte Splenomegalie und höhere Milzzellzahlen als Wildtyp-Kontrollen. In *Salmonellen*-infizierten $TLR2+4^{-/-}$-Mäusen korrelierte die hohe Bakterienlast deutlich mit der ausgeprägten Splenomegalie. Neben der deutlich verstärkten Entzündung fanden sich in TLR2+4-defizienten Mäusen sehr hohe Frequenzen an $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, die sowohl spontan als auch nach *in-vitro*-Restimulation mit HKS, bzw. $OVA_{257-264}$-Peptid oder nach Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk eine IFN-γ-Produktion zeigten. Ähnliches galt für TLR4-defiziente Mäuse, die ebenfalls höhere Bakterientiter und zumindest zu Beginn der Infektion eine stärkere Splenomegalie als Wildtyp-Kontrollen aufwiesen. Auch in diesen Mäusen waren während der ersten 30 Tage nach Infektion mehr IFN-γ^+ $CD4^+$ T-Zellen und IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen als in C57BL/6-Kontrollen vorhanden.

Aufgrund einer natürlichen Mutation im tlr4-Genlokus reagieren C3H/HeJ Mäuse nicht auf LPS und entwickeln keinen septischen Schock (Poltorak *et al.*, 1998). Diese Mäuse zeigen nach Infektion mit virulenten *Salmonellen* eine hohe Suszeptibilität, sie überleben aber ebenfalls die Infektion mit dem *aro*A^--*S. typhimurium* Stamm SL7207 und entwickeln als Folge eine schützende Immunantwort gegen eine spätere Infektion mit virulenten *S. typhimurium*

Organismen (Eisenstein *et al.*, 1984;O'Brien *et al.*, 1980). Die vorliegenden Daten für TLR4- und TLR2+4-defiziente Mäuse mit C57BL/6- Hintergrund bestätigen die in C3H/HeJ Mäusen generierte Immunantwort, da alle für die Versuche verwendeten Mäuse eine unkontrollierte Vermehrung der *Salmonellen* unterbinden konnten und die Infektion mit *aro*A$^-$-*Salmonellen* überlebten.

Während der *Salmonellen*-Infektion wurden deutliche Unterschiede in der Immunantwort zwischen TLR2+4-defizienten Mäusen und MyD88-defizienten Mäusen sichtbar. So zeigten TLR2+4$^{-/-}$- Mäuse von Infektionsbeginn an eine starke inflammatorische Immunantwort mit ausgeprägter Splenomegalie und starker IFN-γ-Produktion durch CD8$^+$ und CD4$^+$ T-Zellen. MyD88-defiziente Mäuse hingegen wiesen zwar hohe Bakterientiter auf, bildeten aber, verglichen mit TLR2+4 Mäusen, eine deutlich verzögerte Splenomegalie und eine verzögerte IFN-γ$^+$ T-Zellantwort aus.

Die nur leicht erhöhte Suszeptibilität der TLR2+4$^{-/-}$-, TLR4$^{-/-}$- und MyD88$^{-/-}$-Mäuse gegenüber *aro*A$^-$-*Salmonellen*, steht im Gegensatz zu Beobachtungen in IFN-γ$^{-/-}$ und IFN-γ-Rezeptor$^{-/-}$ Mäusen oder Mäusen, die mit IL-12 mAk behandelt wurden. Diese Mäuse sind deutlich empfindlicher und sterben früh nach einer Infektion mit attenuierten *S. typhimurium* (Hess *et al.*, 1996;Mastroeni *et al.*, 1992;Mastroeni *et al.*, 1996;Raupach *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse zeigen, dass zumindest für attenuierte *Salmonellen*-Stämme, die frühe Kontrolle der bakteriellen Vermehrung auf von IL-12- und IFN-γ-abhängigen Mechanismus beruht aber unabhängig von TLR2, TLR4 und Myd88 verlaufen kann. Auch TNF-α ist im Gegensatz zu TLR2, TLR4 und MyD88 essentiell für die Kontrolle der bakteriellen Replikation (Nauciel and Espinasse-Maes, 1992;Tite *et al.*, 1991). Es wurde zudem gezeigt, dass TNF-α für die Granulomen-Bildung nach *S. typhimurium*-Infektion notwendig ist (Mastroeni *et al.*, 1995).

Insgesamt zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass Mäuse unabhängig von TLR2, TLR4 und dem zentralen TLR Adapter-Protein MyD88 eine schützende Immunantwort gegen *S. typhimurium* generieren können. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass alle vorliegenden Daten aus Infektionen mit dem attenuierten *aro*A$^-$-*Salmonellen* entnommen sind und die SL7207OVA-Infektion eine vergleichsweise schwache Herausforderung für das angeborene Immunsystem darstellt. Wie eingangs bereits erwähnt, konnte gezeigt werden, dass TLR2, TLR4

und MyD88 eine wichtige Funktion in der frühen, angeborenen Immunantwort gegen virulente *S. typhimurium*-Stämme einnehmen.

6.1.1 TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse überleben die Infektion mit *S. typhimurium* SL7207OVA

Die *Salmonellen*-Infektion ist in der Maus durch hohe Bakterientiter in der Milz, eine erhöhte Zellularität der Milz und eine korrespondierende Splenomegalie gekennzeichnet. (Mittrucker *et al.*, 2002). In allen drei Parametern unterschieden sich TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse von den Wildtyp-Kontrollen. TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse und MyD88$^{-/-}$- Mäuse zeigten hierbei die auffälligsten Unterschiede. Nach Infektion mit attenuierten *Salmonellen* wiesen TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse und auch MyD88$^{-/-}$-Mäuse deutlich höhere bakterielle Titer in Milz und Leber als infizierte Wildtyp-Kontrollen auf. Zusätzlich zu dem hohen bakteriellen Titer war die Klärung der *Salmonellen* deutlich verzögert und in einem Teil der TLR2+4$^{-/-}$ und MyD88$^{-/-}$-Mäuse waren noch nach 5 Monaten *Salmonellen* nachweisbar. Es läßt sich daher spekulieren, ob die Qualität der T-Zellantwort in MyD88-defizienten und TLR2+4-defizienten Mäusen unterschiedlich und eventuell schlechter ist als in C57BL/6-Kontrollen. Bisher konnte nicht gezeigt werden, dass murine T-Zellen direkt *S. typhimurium* töten können. Vielmehr liegt ihre antibakterielle Funktion auf der Aktivierung professioneller Phagozyten. Es ist vorstellbar, dass Phagozyten selbst in der Gegenwart von T-Zellen TLR-vermittelte Signale brauchen um ihre Funktion vollständig ausüben zu können. Das Fehlen dieser TLR-vermittelten Signale könnte für die verzögerte und verminderte Kontrolle der bakteriellen Replikation trotz der Gegenwart *S. typhimurium* spezifischer T-Zellen und B-Zellen in TLR2$^{-/-}$-Mäusen, TLR4$^{-/-}$-Mäusen, TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen und MyD88$^{-/-}$-Mäusen ausschlaggebend sein.

Obwohl MyD88$^{-/-}$-Mäuse an Tag 10 nach Infektion die größte Bakterienlast in Milz und Leber aufwiesen, zeigten diese Mäuse, verglichen mit Wildtyp-Kontrollen, erstaunlicherweise kaum eine Veränderung der Milzgröße und entwickelten erst langsam eine Splenomegalie. Anders als TLR2+4-defiziente Mäuse klärten TLR2-defizienten Mäusen die *Salmonellen* bereits früh in der Infektion. TLR4-defiziente Mäuse zeigten eine verspätete Eliminierung der Bakterien. Es war aber deutlich zu

erkennen, dass erst die TLR2+4 Doppeldefizienz zu einer deutlich verzögerten Klärung der *Salmonellen* führt. Ähnliches galt für die Splenomegalie. TLR2$^{-/-}$-Mäuse zeigten kaum Zunahme in Milzgröße und -gewicht. Dahingegen entwickelten TLR4-defiziente Mäuse bereits früh in der Infektion eine Splenomegalie, die aber nach kurzer Zeit wieder abnahm. Auch hier zeigte die Abwesenheit von TLR2 und TLR4 einen synergistischen Effekt, da die Splenomegalie deutlich stärker ausgeprägt war als in TLR2$^{-/-}$-Mäusen und TLR4$^{-/-}$-Mäusen. TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse entwickelten während der gesamten Infektion eine massive Splenomegalie, die mit hohen *Salmonellen*-Titern einherging. Insgesamt war in allen untersuchten Mäusen die Splenomegalie nur begrenzt auf einen Zuwachs in der T-Zellpopulation zurückzuführen. Der Influx von Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere von Makrophagen und Granulozyten, könnte damit einen Großteil der Splenomegalie nach *S. typhimurium*-Infektion ausmachen. Es ist bekannt, dass Neutrophile eine der ersten Zellpopulationen sind, die entlang eines chemotaktischen Gradienten zum Infektionsort migrieren können (Nathan, 2006;Seiler *et al.*, 2000). Weiterhin ist bekannt, dass nach Infektion mit *Salmonellen* Neutrophile Granulozyten in die Milz einwandern (Cheminay *et al.*, 2004). Zusätzlich konnte in Depletionsexperimenten gezeigt werden, dass neben Makrophagen vor allem Neutrophile für die Kontrolle der bakteriellen Replikation nach *S. typhimurium*-Infektion oder *S. dublin*-Infektion essentiell sind (Conlan, 1997;Seiler *et al.*, 2000;Vassiloyanakopoulos *et al.*, 1998). An Tag 10 nach Infektion mit *S. typhimurium* zeigten Milzschnitte von C57BL/6-Mäusen, TLR2+4- und MyD88-defizienten Mäusen nach klassischer H/E-Färbungen deutliche Unterschiede in der Zellularität. Hierbei war in MyD88-defizienten Mäusen eine deutlich schwächere Zellinfiltration als in C57BL/6-Mäusen oder TLR2+4-defizienten Mäusen zu erkennen. Diese Experimente und weiterführende Versuche werden zurzeit durchgeführt.

Um die unterschiedlich stark ausgeprägte Splenomegalie der TLR2+4-defizienten, MyD88-defizienten Mäuse im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen näher zu analysieren, wurde ein Expressionsprofil verschiedener Chemokine erstellt. An Tag 10 nach Infektion wurde mRNA aus der Milz von MyD88$^{-/-}$- oder TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen mit Hilfe der quantitativen Reversen Transkriptase (RT) PCR untersucht und mit dem mRNA-Profil infizierter Wildtyp-Kontrollen verglichen. Chemokine sind in der

Regulation der Wanderung von Leukozyten beteiligt (Campbell *et al.*, 2003). Die unterschiedliche Expression der Chemokine gibt daher Aufschluss über die nach *Salmonellen*-Infektion in die Milz rekrutierten Zellen des Immunsystems.

Nach Infektion mit *S. typhimurium* nahm die Expression der meisten untersuchten CXC-Chemokine in C57BL/6-Mäusen zu. Die hier analysierten CXC-Chemokine binden an CXCR-1 und CXCR-2 (CXCL-1, CXCL-2, CXCL-5, CXCL-7) oder CXCR-3 (CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11). Die Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2 sind im Allgemeinen für das Rekrutieren von PMN (Polymorphnukleären granulozytären)-Zellen verantwortlich. So können CXCL-4 und CXCL-5 unter anderem Neutrophile Granulozyten effektiv rekrutieren und CXCL-5 kann diese zudem aktivieren (Walz *et al.*, 1991). CXCL-4 ist in der Degranulierung von Neutrophilen nach Aktivierung durch TNF-α und Adhäsion an Endothelzellen, involviert (Kasper *et al.*, 2004). CXCL-7 vermittelt die Migration Neutrophiler Zellen über Endothel-Barrieren. Makrophagen aber auch Endothelzellen induzieren nach IFN-γ-Stimulation CXCL-9 und CXCL-10. CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 stellen IFN-γ-induzierbare und T-Zell-chemotaktische Chemokine dar und spielen für das Wandern von Lymphozyten eine wesentliche Rolle (Rossi and Zlotnik, 2000;Zlotnik and Yoshie, 2000). Darüber hinaus können nach CXCR-3-Bindung auch NK Zellen rekrutiert werden.

Zusätzlich werden in *Salmonellen*-infizierten C57BL/6-Mäusen auch verschiedene CC-Chemokine verstärkt gebildet. Hierzu zählen CCL-1, CCL-2, CCL-4, CCL-5, CCL-6, CCL-7 und CCL-9, die über eine Vielzahl unterschiedlicher CC-Rezeptoren wirken, wobei z.B. CCL-4 und CCL-5 an den CC-Rezeptor 5 binden. Diese Chemokine üben chemotaktische Wirkung auf Monozyten, aktivierte T-Zellen, NK-Zellen und unreife DCs aus. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass CCL-3 sowie CCL-4 zudem eine Rolle in der Wanderung naiver $CD8^+$ T-Zellen zu $CD4^+$ T-Zell-DC Gruppierungen spielen. (Castellino *et al.*, 2006). Die in C57BL/6-Mäusen nach Infektion erhöhte CCL-4-Expression könnte auf ein verstärktes Einwandern naiver $CD8^+$ T-Zellen in die Milz hindeuten. Das Chemokin CCL-7 übt eine starke chemotaktische Wirkung auf eine Reihe von Zelltypen, unter anderem Monozyten, Basophile- und Eosinophile- Leukozyten und auch aktivierte T-Lymphozyten, aus (Baggiolini *et al.*, 1997;Menten *et al.*, 1999). CCL-2 rekrutiert T-Zellen, Monozyten und zusätzlich Mastzellen (Baggiolini *et al.*, 1997) und zeigt in der frühen,

angeborenen Immunantwort nach oraler Infektion mit virulenten *Salmonellen* eine wichtige Funktion. Diese betrifft hauptsächlich die Regulation der inflammatorischen Zytokinantwort des Wirtes und könnte das Migrieren Neutrophiler Zellen oder von Makrophagen zu den jeweiligen Infektionsorten beinhalten (Depaolo *et al.*, 2005). Ein Stimulus zur Produktion dieser Chemokine kann dabei Endotoxin darstellen, wie von Bossink et al. (Bossink *et al.*, 1995) gezeigt werden konnte. Das Chemokin CCL-9 trägt zur Rekrutierung von im Blut zirkulierender Monozyten in das entzündete Gewebe bei. Die so rekrutierten Monozyten können im entzündeten Gewebe dann zu Makrophagen differenzieren.

Insgesamt kann das veränderte Chemokinexpressionsprofil für die Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. von Neutrophilen, DCs, Monozyten und NK-Zellen, aber auch von Zellen des erworbenen Immunsystems wie aktivierte T-Zellen und T_H1-Zellen, in die Milzen der *Salmonellen*-infizierten C57BL/6-Mäuse verantwortlich gemacht werden. Die Summe dieser Zellen ist vermutlich für die Splenomegalie in infizierten C57BL/6-Mäusen verantwortlich. Sehr wahrscheinlich spielen aber Neutrophile, als die größte einwandernde Zellpopulation, hierbei eine entscheidende Rolle.

Obwohl in infizierten MyD88$^{-/-}$-Mäusen die Expression der Chemokine CCL-2, CCL-4, CCL-7, CXCL-2, CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 hochreguliert wurde, konnte gleichzeitig eine nur unwesentlich veränderte Expression der Chemokine CCL-9, CXCL-1, CXCL-4, CXCL-5 und CXCL-7, verglichen mit naiven MyD88-defizienten Mäusen, beobachtet werden (Tabelle 1). Könnte die reduzierte Expression der Chemokine CCL-9, CXCL-1, CXCL-4, CXCL-5 und CXCL-7 der Grund für das Ausbleiben der Splenomegalie in MyD88-defizienten Mäusen an Tag 10 nach *Salmonellen*-Infektion sein? Wie bereits erwähnt, sind CXC-Chemokine, insbesondere CXCL-1, CXCL-4, CXCL-5 und CXCL-7 am Rekrutieren von Neutrophilen beteiligt, daher könnte eine reduzierte Expression dieser Chemokine das Ausbleiben der Neutrophilen Migration in die Milz und damit auch die fehlende Splenomegalie erklären. Das Expressionsprofil der Chemokine CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 die über Bindung an den CXCR-3 u.a. aktivierte T-Zellen, T_H1-Zellen und NK Zellen rekrutieren ist hingegen nach *Salmonellen*-Infektion in MyD88-defizienten Mäusen und C57BL/6-Mäusen ähnlich.

Nach Infektion mit *S. typhimurium* zeigten TLR2+4-defiziente Mäuse eine verstärkte Expression der meisten Chemokine. In TLR2+4-defizienten Mäusen wurde hierbei die mRNA-Expression der Chemokine CCL-2, CCL-4, CCL-7, CXCL-5, CXCL-9 und CXCL-11 im Vergleich zu naiven Kontrollen deutlich verstärkt. Verglichen mit infizierten Kontrollen wiesen infizierte TLR2+4-defiziente Mäuse eine verstärkte CXCL-11-Expression auf. Dieser signifikante Unterschied war aber bereits in den naiven Mäusen sichtbar und ließ auf eine generell höhere Expression des Chemokins in TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen schließen. Zusätzlich exprimierten infizierte TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse weniger CCL-1, CXCL-4 und CXCL-7 als infizierte C57BL/6-Mäuse. TLR2+4-defiziente und C57BL/6-Mäuse zeigten an Tag 10 nach Infektion eine ausgeprägte Splenomegalie. Das insgesamt inflammatorische Chemokinprofil in TLR2+4-defizienten Mäusen läßt nur geringfügige Unterschiede zum Chemokinprofil in Wildtyp-Kontrollen erkennen. Wie in infizierten MyD88$^{-/-}$-Mäusen konnte auch in TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen keine verstärkte Expression der Chemokine CXCL-4 und CXCL-7 festgestellt werden. Die gleichbleibende CCL-9 und CXCL-1 Expression und die verstärkte Expression von CXCL-5 in infizierten TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen zeigte die grundlegende Differenz zu infizierten MyD88-defizienten Mäusen. *Salmonellen*-infizierte TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse wiesen im Vergleich zu infizierten Kontrollen eine zusätzliche Reduktion in der CCL-1 Expression auf. Diese reduzierte CCL-1-Expression war in infizierten MyD88-defizienten Mäusen verglichen mit Wildtyp-Kontrollen nicht der Fall. CCL-1 wird von T-Lymphozyten, Monozyten und Mastzellen sezerniert und wirkt chemotaktisch auf Monozyten und T_H2-differenzierte T-Zellen, aber nicht auf Neutrophile.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zu Beginn der Infektion mit *S. typhimurium* in C57BL/6-Mäusen, TLR4-defizienten Mäusen und besonders in TLR2+4-defizienten Mäuse eine Splenomegalie hervorgerufen wurde, die mit einem hohen Bakterientiter korrelierte. Sowohl in C57BL/6-Mäusen als auch in TLR2+4-defizieten Mäusen konnte darüber hinaus an Tag 10 nach Infektion eine verstärkte Expression inflammatorischer Chemokine nachgewiesen werden. Obwohl MyD88-defiziente Mäuse an Tag 10 nach Infektion die höchste bakterielle Belastung aufwiesen, zeigten diese Mäuse nur eine geringe Vergrößerung der Milz. Das Chemokinprofil in MyD88$^{-/-}$-Mäusen deutete an Tag 10 nach Infektion auf eine schwächere inflammatorische Immunantwort als in C57BL/6-Mäusen hin.

Besonders die Expression der Neutrophile-rekrutierenden Chemokine CXCL-4, CXCL-5 und CXCL-7 unterschied sich in infizierten MyD88-defizienten Mäusen nur unwesentlich von der Expression in naiven Mäusen. Nach *S. typhimurium*-Infektion findet die Replikation der Bakterien vor allem in Leber und Milz der Mäuse statt. In infizierten MyD88-defizienten Mäusen könnte daher ein Ausbleiben der Splenomegalie auf eine fehlende Migration Neutrophiler Granulozyten, und diese fehlende Migration wiederum auf die nur schwache Expression rekrutierender Chemokine zurückgeführt werden. Nach *Salmonellen*-Infektion wurde in C57BL/6-Mäusen und in MyD88-defizienten Mäusen die Expression der IFN-γ-induzierbaren, Monozyten- und T-Zell-chemotaktischen-Chemokine CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 verstärkt. Das ist mit Ausnahme der Expression von CXCL-10 auch in infizierten TLR2+4-defizienten Mäusen der Fall. Die verstärkte Expression von CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 hat zur Folge, dass neben T-Zellen und NK Zellen auch Monozyten zum Infektionsort migrieren.

6.1.2 Die $CD4^+$ T-Zellantwort nach *S. typhimurium* Infektion verläuft unabhängig von TLR2, TLR4 und MyD88

In der Immunantwort nach *Salmonellen*-Infektion spielen T-Zellen, insbesondere $CD4^+$ T-Zellen, eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung mikrobizider Mechanismen in Phagozyten. Diese mikrobiziden Mechanismen führten zur Eliminierung intrazellulärer *Salmonellen*. Im Zuge der Infektion entsteht darüber hinaus eine leistungsfähige Gedächtnis-T-Zellpopulation, die bei erneuter *Salmonellen*-Infektion eine Antigen-spezifische Gedächtnis T-Zellantwort generieren kann.

Eine funktionelle T_H1-Antwort ist für die Bekämpfung der *S. typhimurium* Infektion essentiell, wie die Infektion MHC-Klasse-II-defizienter Mäusen zeigt. Mäuse ohne $CD4^+$ TCR α/β-Zellen und somit ohne T_H1-vermittelte Immunantwort entwickeln nach Infektion mit attenuierten *Salmonellen* eine chronische Entzündung und sterben (Hess *et al.*, 1996). RAG-1/2-defiziente Mäuse und SCID-Mäuse weisen aufgrund fehlender B-und T-Lymphozyten-Populationen eine starke Immundefizienz auf. Die Infektion mit *S. typhimurium* zeigt, dass in RAG-1-defizienten Mäusen und in SCID-Mäusen die Kontrolle der bakteriellen Replikation in den ersten Tagen nach

Infektion unabhängig von Lymphozyten verläuft (Gulig *et al.*, 1997;Mastroeni *et al.*, 1999). Die für die Aktivierung bakterizider Mechanismen in Phagozyten notwendige IFN-γ-Produktion erfolgt in der frühen Phase der *Salmonellen*-Infektion in diesen Mäusen unter anderem durch NK-Zellen. Wie MHC-Klasse-II-defizienter Mäuse, entwickeln auch RAG-1/2-defiziente Mäuse und SCID-Mäuse eine chronische Entzündung und sterben innerhalb kurzer Zeit. Nude-Mäuse, die aufgrund einer fehlerhaften Thymusentwicklung keine T-Lymphozyten generieren, weisen nach Infektion mit *aro*A$^-$-*Salmonellen* eine chronische Infektion auf, die innerhalb weniger Wochen zum Tod der Mäuse führt (Sinha *et al.*, 1997). Diese Infektionsstudien bestätigen die essentielle Bedeutung der T-Zell-vermittelten Immunantwort nach *S. typhimurium* Infektion. Nach Infektion mit *aro*A$^-$-*Salmonellen* entwickelt sich eine CD4$^+$ T-Zellantwort die neben der Hilfe zur Begrenzung der Bakterien-Replikation wesentlich zur Klärung der *Salmonellen* und der Ausbildung von Gedächtnis-T-Zellen beiträgt. Anders als MHC-Klasse-II-defiziente Mäuse überlebten die hier verwendeten TLR-defizienten und MyD88-defizienten Mäuse nicht nur die Infektion mit *aro*A$^-$-*Salmonellen* sie konnten die Bakterientiter auch deutlich reduzieren. Die Reduktion der Bakterientiter und das Überleben der *Salmonellen*-Infektion deutete bereits die Entwicklung einer funktionellen T-Zellantwort an.

In dem hier verwendeten Infektionsmodel war die Messung einer *Salmonellen*-spezifischen CD4$^+$ T-Zellantwort gegen immundominante Epitope nicht möglich, auch stand kein Surrogat-Antigen zur Verfügung. Um trotzdem IFN-γ$^+$ CD4$^+$ T-Zellpopulationen messen zu können, wurde als Ersatz eine *in-vitro*-Restimulation mit hitzegetöteten Salmonellen (HKS) oder mit CD3 mAk und CD28 mAk, durchgeführt. Nach Restimulation mit HKS und insbesondere CD3 mAk und CD28 mAk produzierte ein Großteil der CD4$^+$ T-Zellen IFN-γ. Diese verstärkte IFN-γ-Produktion deutete darauf hin, dass im Rahmen der *Salmonellen*-Infektion eine T_H1 Antwort generiert wurde.

Durch die hohen *Salmonellen*-Titer der Milzen (s. Abb.7) wiesen bereits in Medium inkubierte Proben einen erheblichen Anteil CD4$^+$ T-Zellen auf, die spontan IFN-γ produzierten. Dadurch konnten nach Restimulation mit HKS nur geringfügig mehr IFN-γ-produzierende CD4$^+$ T-Zellen nachgewiesen werden. Die Restimulation mit

CD3 mAk und CD28 mAk ermöglichte eine generelle Aussage über die Anzahl der während der Infektion zu Effektor-T-Zellen ausdifferenzierten $CD4^+$ T-Zellen.

TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse generierten nach Infektion mit *S. typhimurium* eine IFN-γ^+ $CD4^+$ T-Zellantwort. Sowohl TLR2- und TLR4- als auch MyD88- und besonders TLR2+4-defiziente Mäuse zeigten nach *in-vitro*-Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk einen deutlichen Anstieg in der IFN-γ-Produktion. In allen Mäusen war an Tag 30 nach Infektion eine IFN-γ-Produktion der $CD4^+$ T-Zellen erkennbar, die auch deutlich den jeweiligen, durch spontane IFN-γ-Produktion gekennzeichneten Hintergrund übertraf. $CD4^+$ T-Zellen aus $MyD88^{-/-}$-Mäusen konnten nach Infektion mit *S. typhimurium,* wie C57BL/6-Mäuse, IFN-γ produzieren. $TLR2+4^{-/-}$-Mäuse entwickelten nach Restimulation mit HKS und insbesondere nach CD3 mAk und CD28 mAk Restimulation eine, von Infektionsbeginn an starke IFN-γ-Produktion. Darüber hinaus zeigten $CD4^+$ T-Zellen dieser Mäuse bereits eine spontane IFN-γ-Produktion nach Inkubation mit Medium alleine. Im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen zeigten TLR2-defiziente Mäuse nach *Salmonellen*-Infektion eine moderate IFN-γ-Produktion, die nur geringfügig von der in Wildtyp-Kontrollen abwich. Im Vergleich zu C57BL/6-Kontrollen zeigten TLR4-defiziente Mäuse eine nur unwesentlich stärkere spontane IFN-γ-Produktion. Hingegen wiesen TLR4-defiziente Mäuse nach Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk, zumindest an Tag 10 und 30 nach Infektion, eine deutlich stärkere IFN-γ-Produktion verglichen mit Wildtyp-Kontrollen auf. An Tag 10 nach *Salmonellen*-Infektion konnte eine verstärkte IFN-γ Expression in der Milz von $MyD88^{-/-}$-Mäusen, $TLR2+4^{-/-}$-Mäusen und C57BL/6- Mäusen auch mittels RT PCR bestätigt werden. Die in allen infizierten Mäusen gemessenen IgG-Titer bestätigten die Bildung von T-Helferzellen, da für den Antikörper-Isotypenwechsel T-Zellhilfe notwendig ist. Zusätzlich dazu belegt die Ausbildung von IgG2a- und IgG2b-Titern die Entwicklung einer T_H1-Antwort in sämtlichen Mäusen.

$MyD88^{-/-}$-Mäuse zeigten eine deutliche Zunahme in der IFN-γ-Produktion nach Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk. Besonders an Tag 30 nach Infektion war eine ausgeprägte IFN-γ^+ $CD4^+$ T-Zellantwort detektierbar, die zeitgleich mit einer verstärkten Splenomegalie und erhöhten Bakterien-Titern in der Milz dieser Mäuse auftrat.

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass starke, TLR2-vermittelte Signale die Suppression durch regulatorische T-Zellen kurzzeitig aufheben können und zu einer starken IFN-γ-vermittelten inflammatorischen Immunantwort führen (Sutmuller *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde gezeigt, dass in Abwesenheit dieser TLR2-vermittelten Signale die immunsuppressiven Eigenschaften der regulatorischen T-Zellen wiederhergestellt wurden (Sutmuller *et al.*, 2006). Demnach könnte in TLR2-defizienten Mäusen die schwache $CD8^+$ IFN-γ^+ T-Zellantwort zumindest teilweise durch die Signale regulatorischer T-Zellen erklärt werden. Der geringe bakterielle Titer und die schwache Splenomegalie wiesen zudem auf eine reduzierte Entzündung in TLR2-defizienten Mäusen hin. $TLR2^{-/-}$-Mäuse und C57BL/6-Mäusen zeigten eine vergleichbare IgG2a und IgG2b Antwort, die neben der IFN-γ-Produktion der $CD4^+$ T-Zellen für die Ausbildung einer T_H1-Antwort spricht.

Die Rolle der TLR und des TLR-Adapters MyD88 in der Bildung einer T_H1-Antwort wird kontrovers diskutiert. So wird z.B. postuliert, dass MyD88 essentiell für die Ausbildung der T_H1-Antwort ist (Schnare *et al.*, 2001). Für die Generierung einer $CD8^+$ T-Zellantwort und $CD4^+$ T_H1-Antwort nach *L. monozytogenes*-Infektion sind jedoch weder TLR2 noch MyD88 notwendig (Kursar *et al.*, 2004). Die Infektion mit MCMV (mouse Cytomegalovirus) oder *B. burgdorferi* zeigt weiterhin, dass in den infizierten Mäusen T-abhängige Antikörper gebildet werden können (Bolz *et al.*, 2004;Delale *et al.*, 2005;Liu *et al.*, 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit generierten MyD88-defiziente Mäuse nach Infektion mit *S. typhimurium* eine $CD4^+$ T_H1-Antwort und T-abhängige Antikörper. Für die Analyse unterschiedlicher Zytokine wurde an Tag 10 nach *Salmonellen*-Infektion mittels PCR die mRNA-Expression in C57BL/6-Mäusen, TLR2+4-defizienten Mäusen und MyD88-defizienten Mäusen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass hierbei vor allem IL-4 in infizierten MyD88-defizienten Mäusen verstärkt gebildet wurde. Im Gegensatz dazu zeigten infizierte Wildtyp-Mäuse eine nur unwesentliche Induktion der IL-4-Expression. Die verstärkte IL-4-Expression könnte zusammen mit dem ausgeprägten IgG1-Titer eine zusätzliche T_H2-Antwort in MyD88-defizienten Mäusen widerspiegeln. Im Gegensatz zu *Salmonellen*-infizierten MyD88-defizienten Mäusen fand sich in TLR2+4-defiziente Mäuse, ähnlich wie in den C57BL/6-Kontrollen, deutlich weniger IL-4 als in den naiven Kontrollen.

Wie in infizierten Wildtyp-Kontrollen wurde auch in infizierten MyD88$^{-/-}$- und TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen IL-10 deutlich stärker gebildet. Neben T-Zellen können auch aktivierte Monozyten dieses immunsuppressiv-wirkende Zytokin im Verlauf der Entzündung produzieren. IL-10 agiert als anti-inflammatorisches Zytokin, in dem es die Makrophagenfunktion hemmt und somit eine überschießende Entzündungsreaktion verhindert. In MyD88-defizienten Mäusen könnte IL-10 die vorhandene anti-inflammatorische Wirkung von IL-4 noch verstärken.
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach *S. typhimurium*-Infektion neben C57BL/6-Mäusen sowohl TLR2+4-defiziente Mäuse als auch MyD88-defiziente Mäuse IFN-γ^+ CD4$^+$ T-Zellen generieren können. In Zusammenhang mit den ausgeprägten IgG2a und IgG2b-Titer weist das auf eine T_H1-Antwort in diesen Mäusen hin.

6.1.3 TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse generieren eine spezifische CD8$^+$ T-Zellantwort

Für die Immunantwort nach *S. typhimurium*-Infektion spielt neben der T_H1-Antwort auch die Ausbildung der CD8$^+$ T-Zellantwort eine entscheidende Rolle (Hess *et al.*, 1996;Lo *et al.*, 1999;Mittrucker and Kaufmann, 2000). Nach Infektion mit SL7207OVA konnte aufgrund der Präsentation des Surrogatpeptids $OVA_{257-264}$-Peptid im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen eine spezifische CD8$^+$ T-Zellantwort generiert werden. Diese spezifischen CD8$^+$ T-Zellen konnten hierbei über Bindung von $OVA_{257-264}$-spezifische-MHC-Klasse-I-Tetrameren nachgewiesen werden. Die Differenzierung der CD8$^+$ T-Zellen zu IFN-γ^+ CD8$^+$ T-Zellen wurde durch *in-vitro*-Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid gezeigt. Die Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk ermöglicht eine Aussage über die Anzahl der während der Infektion zu Effektor-T-Zellen ausdifferenzierten CD8$^+$ T-Zellen. Nach *Salmonellen*-Infektion generierten alle hier untersuchten Mäuse $OVA_{257-264}$-spezifische CD8$^+$ T-Zellen, die nach *in-vitro*-Restimulation mit SIINFEKL-Peptid IFN-γ sezernierten. Nach *in-vitro*-Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk konnte eine verstärkte IFN-γ-Produktion beobachtet werden, die auf die Differenzierung der im Verlauf der Infektion generierten, *Salmonellen*-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen hindeutete. MyD88-defiziente Mäuse bildeten eine zu C57BL/6-

Mäusen vergleichbare $OVA_{257-264}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort aus. $CD8^+$ T-Zellen aus $MyD88^{-/-}$-Mäusen produzierten jedoch weniger IFN-γ als Wildtyp-Kontrollen, wie nach Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid gezeigt werden konnte. Hinzu kommt, dass in $MyD88^{-/-}$-Mäusen an Tag 20 nach Infektion $CD8^+$ T-Zellen nach SIINFEKL-Peptid-Restimulation deutlich weniger IFN-γ bildeten, als durch $OVA_{257-264}$-Tetramer-Färbung zu erwarten gewesen wäre. Frequenz und Anzahl der $CD8^+$ T-Zellen, die in MyD88-defizienten Mäusen nach CD3 mAk CD28 mAk *in-vitro*-Restimulation IFN-γ-Produktion aufwiesen, verdeutlichten, dass während der Infektion mit *S. typhimurium* ein großer Teil der $CD8^+$ T-Zellen zu Effektor-T-Zellen differenzierte. TLR2-defiziente Mäuse generierten SIINFEKL-Peptid-spezifische $CD8^+$ T-Zellen, die sich geringfügig im prozentualen Anteil oder in der Anzahl von den in Wildtyp-Kontrollen generierten $OVA_{257-264}$-Peptid-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen unterschieden. Nach Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk konnte in TLR2-defizienten Mäusen und in C57BL/6-Mäusen ein Anstieg in der Anzahl IFN-γ-produzierender $CD8^+$ T-Zellen beobachtet werden. Zusätzlich zur spontanen IFN-γ-Produktion zeigten sowohl TLR2+4- als auch TLR4-defiziente Mäuse hohe Frequenzen und absolute Zellzahlen an $OVA_{257-264}$-Peptid-spezifischen, IFN-γ-produzierenden $CD8^+$ T-Zellen. Es wiesen mehr $CD8^+$ T-Zellen aus $TLR4^{-/-}$-Mäusen und $TLR2+4^{-/-}$-Mäusen verglichen mit Wildtyp-Kontrollen eine IFN-γ-Produktion auf. Diese Rate an IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen lag sowohl in TLR2+4-defizienten als auch in TLR4-defizienten Mäusen bereits an Tag 10 nach Infektion und nach Restimulation mit SIINFEKL-Peptid, selbst unter Berücksichtigung der relativ hohen spontanen IFN-γ-Produktion, zwischen 1 und 2 Prozent der $CD8^+$ T-Zellen. Auch nach Restimulation mit CD3 mAk und CD28 mAk zeigten $TLR4^{-/-}$- und $TLR2+4^{-/-}$-Mäuse bereits von Infektionsbeginn an einen größeren Anteil IFN-γ-produzierender $CD8^+$ T-Zellen als C57BL/6-Mäuse.

MyD88-defiziente Mäuse und C57BL/6-Mäuse generierten während der ersten 20 Tage vergleichbare Frequenzen und auch eine vergleichbare Anzahl an $OVA_{257-264}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen. Obwohl $MyD88^{-/-}$-Mäuse IFN-γ-sezernierende $CD8^+$ T-Zellen generieren konnten, wiesen diese, verglichen mit Wildtyp-Kontrollen, eine deutliche Reduktion in Frequenz und Anzahl auf. Demnach differenzierten insbesondere an Tag 20 nach *Salmonellen*-Infektion nicht alle SIINFEKL-Peptid-

spezifischen $CD8^+$ T-Zellen auch zu IFN-γ^+ sezernierenden Effektor-T-Zellen, wie nach $OVA_{257-264}$-Peptid-Restimulation gezeigt werden konnte. Für eine eindeutige Klärung dieses Sachverhaltes bedarf es jedoch weiterführender Experimente. So könnte ein Genexpressionsprofil von $OVA_{257-264}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen aus MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu $OVA_{257-264}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen an Tag 20 nach *Salmonellen*-Infektion Aufschluß über die unterschiedliche Frequenz und Anzahl IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen geben.

In $TLR4^{-/-}$- und besonders in $TLR2+4^{-/-}$-Mäusen korrelierte die im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen erhöhte bakterielle Belastung mit einer erhöhten Frequenz und einem erhöhten Anteil IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen und IFN-γ^+ $CD4^+$ T-Zellen. Die T-Zellantwort war in $TLR4^{-/-}$- und $TLR2+4^{-/-}$-Mäusen verglichen mit C57BL/6-Mäusen verstärkt. Vermutlich induzierte die schwere Entzündung sowohl in $TLR4^{-/-}$-Mäusen als auch in $TLR2+4^{-/-}$-Mäusen Signale, die zu einer verstärkten Expansion und Differenzierung der einzelnen Effektor-T-Zellpopulation führten. Trotzdem führte diese ausgeprägte IFN-γ-Produktion der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in TLR2+4-defizienten Mäusen erst verzögert zu einer Reduktion der *Salmonellen*-Titer in Milz und Leber.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Generierung $OVA_{257-264}$-spezifische IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen nach Infektion mit *aro*A^--*Salmonellen* Stamm SL7207OVA unabhängig von TLR2, TLR4 und MyD88 verlief. Wie die Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid und insbesondere mit CD3 mAk CD28 mAk zeigte, konnten offensichtlich alle hier untersuchten Mäuse eine $CD8^+$ T-Zellantwort generieren, die zumindest in Bezug auf die IFN-γ-Produktion funktionsfähig war.

6.1.4 TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse bilden nach *S. typhimurium*-Infektion eine humorale Immunantwort

Die Infektion mit *S. typhimurium* stellt eine Infektion mit fakultativ intrazellulären Bakterien dar, in der neben T-Zellen auch B-Zellen einen wichtigen Anteil an der Klärung der Bakterien und der Bildung einer Gedächtnis-Immunantwort haben (Mittrucker *et al.*, 2000).

TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse entwickelten eine T-unabhängige und T-abhängige Antikörper-Antwort gegen *S. typhimurium*-Antigene.

Verglichen mit Wildtyp-Kontrollen zeigten TLR2-, TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse eine normale IgM- und IgG2a-Antwort. Die IgG2b-Titer waren im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen nur unwesentlich erhöht. In der Ausbildung von IgG1-Titern wiesen TLR2+4-defiziente und TLR4-defiziente Mäuse im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen leicht erhöhte Titer auf. Die IgG1-Antwort war in TLR2-defizienten Mäusen mit der in Wildtyp-Kontrollen vergleichbar. MyD88$^{-/-}$-Mäuse hingegen zeigten in dem hier verwendeten Infektionsmodell verglichen mit Wildtyp-Kontrollen deutlich verstärkte IgG1 Titer. Diese verstärkten IgG1-Titer wiesen auf eine Abweichung in der Antikörperantwort nach *S. typhimurium*-Infektion in MyD88-defizienten Mäusen hin.

Obwohl *Salmonellen*-LPS als starkes B-Zellmitogen wirkt, zeigte sich nach Infektion mit *S. typhimurium* eine Antikörper-Produktion, die unabhängig von TLR2, TLR4 oder MyD88 verlief. Es könnten im Fall der TLR2-, TLR4- und TLR2+4-defizienten Mäuse andere TLR die *Salmonellen* erkennen, z.B. werden TLR5 oder TLR9, durch Flagellin bzw. bakterielle DNA stimuliert (Hayashi *et al.*, 2001;Hemmi *et al.*, 2000). In MyD88-defizienten Mäusen können MyD88-unabhängige TLR-Signale in der B-Zellstimulation eine Rolle spielen. (Kawai and Akira, 2006). Alternativ dazu sind *Salmonellen*-generierte Signale, die unabhängig von dem TLR/MyD88-Signalweg ablaufen, bei der B-Zellaktivierung und Antikörperbildung möglich. Das würde zusätzlich die Unterschiede zu anderen Studien erklären (Pasare and Medzhitov, 2005;Schnare *et al.*, 2001), in denen aufgereinigtes Protein und nur definierte TLR-Liganden zur Antikörper-Induktion verwendet wurden. In diesen Versuchen kann eine Beteiligung TLR/MyD88-unabhängiger Signale ausgeschlossen werden. TLR/MyD88-unabhängigen Signale könnten jedoch während einer Infektion eine wichtige Rolle spielen. Der Isotypenwechsel von IgM zu IgG benötigt T-Zellhilfe. Die Ausbildung von IgG2a und IgG2b verdeutlicht die T-Zelldifferenzierung zu einer T_H1-dominierten T-Zellantwort. Daher konnte in der vorliegenden Arbeit eine $CD4^+$ T-Zellantwort indirekt über die erfolgte IgG2a und IgG2b-Reifung nachgewiesen werden. Eine verringerte T_H1-Zytokinproduktion und /oder verstärkte T_H2-Zytokinbildung könnten eine Verlagerung von einer IgG2a/IgG2b- zu einer IgG1-vermittelten Immunantwort bewirken. Das könnte z.B. nach *Salmonellen*-Infektion in MyD88-defizienten Mäusen der Fall sein, da in diesen Mäusen eine verstärkte IgG1–Produktion im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gezeigt

wurde. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in anderen Infektionsmodellen beobachtet werden. So generieren MyD88$^{-/-}$-Mäuse nach Infektion mit murinem Cytomegalievirus (MCMV) oder *Borellia burgdorferi* eine T-abhängige Antikörper-Antwort (Bolz *et al.*, 2004;Delale *et al.*, 2005;Liu *et al.*, 2004). In *B. burgdorferi* infizierten Mäusen konnten leicht reduzierte IgG2a und IgG2b Titer nachgewiesen werden, wohingegen die IgG1 Immunantwort in diesen Mäusen erhöht war.
Wie T-Zellen, können auch B-Zellen TLR bilden, hier vor allem TLR4 und RP105 (Takeda *et al.*, 2003). Nach Bindung der entsprechenden Liganden werden diese TLR aktiviert. In früheren Studien wurde die MyD88-abhängige TLR-Signalübermittlung für die erfolgreiche T-Zellabhängige Antikörperantwort nach Protein-Antigen Inkubation, postuliert (Pasare and Medzhitov, 2005;Schnare *et al.*, 2001). In diesen Studien ist die IgG2a- und IgG2c-Antwort beeinträchtigt, wohingegen der IgG1-Titer nicht betroffen ist. Im Gegensatz dazu konnte die vorliegende Arbeit diese Beobachtungen nicht bestätigen. Sowohl TLR2$^{-/-}$- und TLR4$^{-/-}$-, als auch TLR2+4$^{-/-}$- und MyD88$^{-/-}$- Mäuse generierten neben IgM-Titern auch ausgeprägte IgG2a- und IgG2b-Titer. Die T-unabhängige und T-abhängige Antikörper-Antwort gegen *S. typhimurium* Antigene war daher weitgehend unabhängig von TLR2, TLR4 und MyD88.

6.1.5 Zytokinprofil an Tag 10 nach *S.typhimurium* Infektion

Wie zuvor erwähnt, wurde zusätzlich zum Chemokinprofil auch ein Zytokinprofil *Salmonellen*-infizierter C57BL/6-Mäuse, MyD88-defizienter und TLR2+4-defizienter Mäuse erstellt. Generell konnte in C57BL/6-Mäusen nach Infektion mit *aro*A$^-$-*Salmonellen* eine Zunahme in der Expression inflammatorischer, aber auch einiger anti-inflammatorisch-wirkender Zytokine beobachtet werden. Besonders IFN-γ, IFN-β, IL-6, IL-21 und IL-10 wurden verstärkt gebildet. Eine verstärkte IFN-γ Expression führt neben der Aktivierung bakterizider Mechanismen in Phagozyten auch zur Differenzierung der T-Helferantwort zu einer T_H1-Antwort. IFN-β vermittelt in vielen Zellen einen antiviralen Status, hemmt die Zellproliferation und hilft bei der Modulation der Immunantwort nach Infektion. Zusätzlich reguliert IFN-β nach Bindung an den Typ-I-IFN-Rezeptor die Expression von MHC-Molekülen herauf. IL-6 induziert in der Leber die Ausschüttung von Proteinen der akuten Phase

und ist wie IL-1α wichtiger Bestandteil der inflammatorischen Immunantwort. Daneben kann IL-6 die Differenzierung von B-Zellen und die Antikörperproduktion stimulieren. Das Zytokin IL-10 gehört hingegen zu den immunsuppressiven Zytokinen und ist ein wirksamer Inhibitor der Makrophagenfunktion. IL-10 unterbindet die Expression von TNF-α und IL-1 in Phagozyten, und wirkt wie IL-4 unterstützend auf die Ausbildung einer humoralen Immunantwort.

MyD88$^{-/-}$-Mäuse und C57BL/6-Mäuse wiesen ein ähnliches Zytokinprofil bezüglich der IFN-γ-Expression und auch der Expression weiterer inflammatorischer Zytokine an Tag 10 nach Infektion auf. Nach Infektion mit *S. typhimurium* zeigte die Expression der Zytokine IL-10 und IL-6 in MyD88-defizienten Mäusen eine, mit C57BL/6-Mäusen vergleichbare Expression. In naiven Mäusen war kein Unterschied zwischen MyD88$^{-/-}$-Mäusen und Wildtyp-Kontrollmäuse bezüglich der IL-4- und IL-21-Expression zu erkennen. Wie in Tabelle 1 gezeigt, veränderte sich die Expression der Zytokine IL-21 und IL-4 nach Infektion und wies dann einen signifikanten Unterschied zwischen C57BL/6- Mäusen und MyD88$^{-/-}$-Mäusen auf. Beide Zytokine vermitteln nach Bindung an ihren Rezeptor Signale über die gemeinsame γ- Kette. Es konnte gezeigt werden, dass IL-4 Signale essentiell bei der Generierung einer IgG1-vermittelte Immunantwort sind (Murphy and Reiner, 2002).

In-vitro-Studien weisen IL-21 eine Rolle in der Verstärkung der IgG1-Produktionen in B-Zellkulturen zu (Ozaki *et al.*, 2002). Ferner wurde gezeigt, dass IL-21 besonders von T_H2-Effektorzellen produziert wird. (Wurster *et al.*, 2002). Die früh in der Infektion auftretende, verstärkte IgG1 Immunantwort infizierter MyD88$^{-/-}$-Mäuse bestätigte diese Beobachtungen und gibt einen weiteren Hinweis auf eine zusätzliche T_H2-Antwort in MyD88-defizienten Mäusen. Es ist bemerkenswert, dass infizierte C57BL/6-Mäuse deutlich mehr IFN-β produzierten als infizierte MyD88-defiziente Mäuse. Es wäre anzunehmen, dass gerade in MyD88-defiziente Mäusen verstärkt der alternative Signalweg über die Adapterproteine TRAM und TRIF genutzt würde und dadurch eine verstärkte IFN-β-Expression ausgelöst werden würde.

MyD88-defiziente Mäuse bildeten sowohl inflammatorische als auch anti-inflammatorische Zytokine. Jedoch war die Expression von inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-1α oder IFN-β in MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen deutlich abgeschwächt. Ein Grund für die deutlich schwächere Expression dieser Zytokine könnte nach dem Erkennen von mikrobiellen Strukturen

im Defekt der Signalweiterleitung liegen, so dass die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NFκB, und die damit verbundene Expression von Zytokinen erst verzögert, über MyD88-unabhängige Signalwege, stattfindet. Die in MyD88-defizienten Mäusen vorhandene Expression von IFN-γ kann jedoch auch über die Bindung von IL-12 an den IL-12-Rezeptor induziert werden. Hierbei wird die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-4 ausgelöst, der wiederum die IFN-γ-Expression induziert (Neurath *et al.*, 2002). Weiterhin könnte allein der hohe Bakterientiter und die damit verbundene Anwesenheit großer Mengen Pathogen-assoziierter molekularer Strukturen vermutlich zur Erkennung durch TLR-unabhängige Strukturerkennungsrezeptoren führen. Das wiederum könnte dann die Sezernierung von Chemokine und Zytokine bewirken.

TLR2+4$^{-/-}$-Mäuse zeigten an Tag 10 nach Infektion im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen eine verstärkte Expression inflammatorischer Zytokine, wie z.B. IFN-β, IL-1α und zusätzlich IL-27. Das ausgeprägte inflammatorische Zytokinprofil spiegelte die starke Entzündung in der Milz zu diesem Zeitpunkt wieder. Hinzu kommt, dass in TLR2+4-defizienten Mäusen genau wie in Kontroll-Mäusen auch die IL-4-Expression stark herunterreguliert wurde. Das Zytokinprofil der Mäuse wies somit auf eine verstärkte T_H1-Antwort hin, die unabhängig von TLR2 oder TLR4 verlaufen könnte.

Die in TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen und MyD88$^{-/-}$-Mäusen gemessenen Zytokinprofile spiegelten eine Infektion in diesen Mäusen wieder. Infizierten C57BL/6-Mäusen bildeten an Tag 10 nach Infektion inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine, die auch in TLR2+4-defizienten Mäusen und MyD88-defizienten Mäusen zumeist verstärkt vorlagen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ausbildung einer erworbenen Immunantwort nach Infektion mit *aro*A$^-$-*Salmonellen* unabhängig von TLR2, TLR4 und MyD88 verläuft. TLR4$^{-/-}$-, TLR2+4$^{-/-}$- und MyD88$^{-/-}$-Mäuse zeigten trotz der vorliegenden T_H1-Antwort, der Antikörpertiter und $CD8^+$ T-Zellantwort eine reduzierte Fähigkeit die *Salmonellen* innerhalb der gleichen Zeitspanne wie C57BL/6-Mäuse zu eliminieren. Die Entwicklung der erworbenen Immunantwort nach *S. typhimurium*-Infektion verläuft vermutlich nicht unabhängig von so genannten "Danger-Signalen" oder Entzündungssignalen, die im Verlauf der Infektion generiert werden. *S. typhimurium* kann zum Beispiel auch über TLR5 (Flagellin) und TLR9 (bakterielle DNA) erkannt werden und beide TLR könnten an

der Generierung einer funktionsfähigen angeborenen und auch erworbenen Immunantwort beteiligt sein.

Außerdem können nach Ligandenbindung an TLR4, MyD88-unabhängige Signalwege zur Aktivierung von NFκB und IRF3 führen und diese alternativen Signalwege könnten die Entwicklung einer erworbenen Immunantwort unterstützen. Letztendlich spielen auch TLR/MyD88-unabhängige Strukturerkennungsrezeptoren bei der Aktivierung der Immunantwort gegen Pathogene eine entscheidende Rolle. C-Typ-Lectin-Rezeptoren, Scavenger-Rezeptoren und auch Rezeptoren der CARD/NOD Familie könnten Entzündungssignale generieren, die für die Entstehung einer erworbenen Immunantwort wesentlich sind (Brown, 2006;Gordon, 2002;McGreal *et al.*, 2005;Ting *et al.*, 2006). Diese alternativen Signalwege werden zurzeit untersucht.

6.1.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann der Schluß gezogen werden, dass weder TLR2 noch TLR4 oder MyD88 für die Entstehung einer humoralen oder zellulären, erworbenen Immunantwort nach *S. typhimurium*-Infektion notwendig sind. Die untersuchten TLR2+4-, TLR2-, TLR4- und MyD88-defizienten Mäuse konnten eine Infektion mit *S. typhimurium* kontrollieren, d.h. die ungehemmte Vermehrung der Pathogene in Milz und Leber unterbinden. In diesem Zusammenhang unterschieden sich die hier verwendeten Mäuse deutlich von MHC-Klasse-II-defizienten Mäusen, da letztere eine chronische Infektion mit hohen bakteriellen Titern entwickeln und einer Infektion mit *aro*A$^-$-*Salmonellen* erliegen. (Hess *et al.*, 1996). In Bezug auf die zelluläre Immunantwort hat das zentrale TLR-Adapter-Proteine MyD88 Einfluss auf die Produktion von IFN-γ durch CD8$^+$ T-Zellen. Das konnte anhand einer reduzierten Anzahl und Frequenz IFN-γ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen bei gleichbleibender Anzahl und Frequenz $OVA_{257-264}$-MHC-Klasse-I-Tetramere-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen gezeigt werden. TLR2 und TLR4 waren für die Generierung IFN-γ-sezernierender T-Zellen nicht notwendig, im Gegenteil, in Abwesenheit dieser TLR produzierten mehr CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen IFN-γ als in Wildtyp-Kontrollen. TLR4-, TLR2+4- und MyD88-defiziente Mäuse überlebten die Infektion mit *S. typhimurium*, obwohl der Bakterien-Titer lange Zeit auf hohem Niveau verblieb. Im Vergleich zu

Kontroll-Mäusen war die Klärung der *Salmonellen* in MyD88$^{-/-}$-Mäusen und TLR2+4$^{-/-}$-Mäusen deutlich verzögert und nicht vollständig, obwohl eine T-Zellantwort in diesen Mäusen generiert werden konnte.

Hinsichtlich weiterführender Experimente könnte z.B. zusätzlich zu den bereits beschriebenen Genexpressionsprofilen auch an späteren Zeitpunkten nach Infektionsbeginn eine Analyse der Zytokin- oder Chemokinexpression durchgeführt werden. Das würde z.B. die Analyse der, im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen, auch zu späteren Zeitpunkten in der Infektion deutlich verstärkten Splenomegalie TLR2+4-defizienter Mäuse ermöglichen.

Auch MyD88-defiziente Mäuse entwickelten an späteren Zeitpunkten nach Infektionsbeginn eine Splenomegalie, wohingegen die Splenomegalie in C57BL/6-Mäusen zurückging. Der Vergleich der Milz-Chemokinexpressionsprofile von MyD88-defizienten Mäusen und C57BL/6-Mäusen könnte Aufschluß über die unterschiedlich ausgeprägte Splenomegalie in diesen Mäusen geben. Die Analyse der Genexpression in $OVA_{257-264}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen aus MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Kontrollen an Tag 20 nach Infektion könnte Aufschluß über die unterschiedliche Anzahl und Frequenz IFN-γ-sezernierender $CD8^+$ T-Zellen in diesen Mäusen geben. Es sollte zudem der Fragestellung nachgegangen werden, warum in TLR2+4-defizienten Mäusen nach *Salmonellen*-Infektion, im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen, eine deutlich höhere Frequenz und Anzahl IFN-γ^+ T-Zellen zu finden ist. Der adoptive Transfer von T-Zellen aus TLR2+4-defizienten Mäusen in RAG-1/2-defiziente Mäuse und darauffolgende Infektion der Rezipienten mit *S. typhimurium* könnte hierzu Aufschluß geben.

6.2 Frühe, Antigen-unabhängige T-Zellaktivierung nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium*

Die Infektion mit *S. typhimurium* induziert in Mäusen, in Abhängigkeit von dem verwendeten *Salmonellen*-Stamm, der Infektionsdosis und dem infizierten Mausstamm, eine $CD8^+$ T-Zellantwort sowie eine funktionelle T_H1-Antwort (Chander *et al.*, 1986;Hess *et al.*, 1996;Mastroeni *et al.*, 1992;Mittrucker and Kaufmann, 2000;Nauciel, 1990). Wie unter 6.1 bereits gezeigt, vergingen 1 bis 2 Wochen bis zur ersten, meßbaren T-Zellantwort. In diesem Zeitraum findet die primäre Aktivierung der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen statt. Die systemische Infektion mit *S. typhimurium* führt in Mäusen zu einer schweren Entzündung mit Symptomen, die vergleichbar sind mit der durch *Salmonella typhi* hervorgerufenen Typhus-Erkrankung des Menschen. Wie sich diese schwere Entzündung auf die Aktivierung und die Differenzierung der T-Zellen auswirkt ist zurzeit noch nicht vollständig bekannt. Es ergibt sich daher eine Reihe von Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollten. Zurzeit ist noch unklar ob und wie die starke, durch Infektion mit *Salmonellen* hervorgerufene, Entzündung naive T-Zellen beeinflusst. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob diese Entzündung zu einer TZR-unbhängigen Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen führen kann. Zusätzlich wurde untersucht, in wie weit die Entzündung auf den Phänotyp und die Funktion der T-Zellen Einfluss nehmen kann. Die Analysen befassten sich mit der von TZR-Signalen unabhängigen Reaktion der T-Zellen. Darüber hinaus wurden T-Zellen untersucht, die eine nachfolgende TZR-Stimulation erfahren. Verändert sich hierbei die T-Zellantwort, und wenn ja, wie? Findet nach *Salmonellen*-Infektion eine verstärkte Aktivierung des erworbenen Immunsystems statt, oder erleiden die Mäuse eine Immunsuppression? Im Rahmen dieser Arbeit sollte außerdem geklärt werden welche potentiellen Faktoren eine veränderte Immunantwort übermitteln könnten.

Für die Generierung einer starken Entzündung wurden in dieser Arbeit *Nramp*-1^s C57BL/6-Mäuse mit virulenten *Salmonellen*, Stamm SL1344, i.v. infiziert. Nach Infektion mit virulenten *Salmonellen* zeigten C57BL/6-Mäuse eine schwere Entzündung der Milz und Leber. Die Mäuse können die Bakterien-Replikation nicht unterbinden und sterben innerhalb weniger Tage. Die Analyse der T-Zellen konnte daher nur in den ersten Tagen nach Infektion stattfinden. Während dieser frühen Zeitpunkte erfolgte in einem Großteil der T-Zellen noch keine gerichtete Antwort

gegen Antigenstrukturen der *Salmonellen*. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass weitgehend TZR-unabhängige Effekte dieser Zellen untersucht wurden. Zusätzlich wurde ein murines T-Zell-Transfersystem mit SIINFEKL-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen als Donorzellen verwendet. Hierbei wurden TZR-transgene OT-1 T-Zellen vor Infektion mit *S. typhimurium* in C57BL/6-Mäuse transferiert. Die OT-1 Zellen erlaubten die Analyse einer einheitlichen T-Zellpopulation, die per se keine *Salmonellen*-Antigene erkennen können. Im Gegensatz zu T-Zellen der Rezipienten konnten OT-1 T-Zellen jedoch *in-vitro* mit $OVA_{257-264}$-Peptid spezifisch aktiviert werden und dadurch die Auswirkung der *Salmonellen*-Infektion auf eine nachfolgende TZR-Stimulation dieser T-Zellen untersucht werden.

Als Positivkontrolle wurden C57BL/6-Mäuse mit L.m.OVA infiziert. Infizierte Zellen präsentieren $OVA_{257-264}$-Peptid im MHC-Klasse-I-Komlex, dadurch werden OT-1 $CD8^+$ T-Zellen TZR-spezifisch aktiviert. Diese $CD8^+$ T-Zellen proliferierten und differenzierten zu IFN-γ-sezernierenden Effektor-T-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigte die Infektion mit SL1344OVA nach Transfer von OT-1 T-Zellen keine Differenzierung der transferierten $CD8^+$ T-Zellen. Die Analyse der Gründe für eine fehlende Proliferation war jedoch nicht Teil dieser Arbeit.

6.2.1 Charakterisierung der $CD8^+$ T-Zellaktivierung nach Infektion mit *S. typhimurium*

Die Expression von CD69 gilt als ein früher Aktivierungsmarker u.a. von T-Zellen (Ziegler *et al.*, 1994). Ein weiterer Aktivierungsmarker ist CD62L (L-Selektin). Aktivierte T-Zellen regulieren die Expression von CD62L herab ($CD62L^{low}$), so dass das Molekül von der Zelloberfläche verschwindet und T-Zellen daraufhin leichter den Lymphknoten verlassen können. Ein erhöhter Anteil der $CD62L^{low}$ T-Zellpopulation weist daher auf eine Aktivierung dieser T-Zellen hin.

Nach Infektion mit *S. typhimurium* wurden $CD8^+$ T-Zellen, wie die CD69 Expression zeigte, aktiviert. Hingegen ließ sich keine veränderte CD62L-Expression dieser $CD8^+$ T-Zellen nachweisen. Nach Infektion mit virulenten *Salmonellen* wurden zuvor transferierte T-Zellen aktiviert, wie anhand der CD69-Expression der T-Zellen erkennbar war (Abb.12). Im Gegensatz dazu fiel auch hier die Aktivierung transferierter $CD8^+$ T-Zellen gemäß der CD62L-Färbung wesentlich schwächer aus.

Nur an Tag 4 nach SL1344-Infektion erhöhte sich kurzzeitig der Anteil an $CD62L^{low}$ $CD8^+$ T-Zellen in der transferierten T-Zellpopulation. Nach Infektion mit *S. typhimurium* zeigten transferierte T-Zellen eine höhere Frequenz $CD69^+$ $CD8^+$ T-Zellen als endogene $CD8^+$ T-Zellen. Zudem wurden transferierte T-Zellen früher als endogene T-Zellen aktiviert, wie anhand der CD69-Expression der transferierten $CD8^+$ T-Zellen an Tag 3 nach *Salmonellen*-Infektion gezeigt werden konnte. Diese $CD8^+$ T-Zellaktivierung spiegelte sich nur geringfügig in einer veränderten CD62L-Expression wieder.

Die Infektion mit L.m.OVA führte in der endogenen $CD8^+$ T-Zellpopulation zur Expression von CD69, aber kaum zu einer veränderten CD62L-Expression. Transferierte $CD8^+$ T-Zellen wurden aufgrund des spezifischen Stimulus durch L.m.OVA schnell und effektiv aktiviert, das zeigte sich in einem deutlich erhöhten Anteil der $CD62L^{low}$ $CD8^+$ T-Zellpopulation. Diese Aktivierung spiegelte sich hingegen nur sehr viel schwächer in der CD69-Expression der $CD8^+$ T-Zellen wieder.

6.2.2 Charakterisierung der $CD8^+$ T-Zellfunktion nach Infektion mit virulenten S. typhimurium

Nach *Salmonellen*-Infektion wurden T-Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Differenzierung in Zytokin-produzierende Effektor-T-Zellen untersucht. Um eine funktionelle Analyse der T-Zellen durchführen zu können, wurde das bereits beschriebene Transfersystem verwendet. Der Transfer von OT-1 T-Zellen zeigte, dass naive $CD8^+$ T-Zellen ohne Stimulation kaum IFN-γ oder TNF-α produzierten. Nach Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid konnte eine leichte IFN-γ- und TNF-α-Produktion innerhalb dieser $CD8^+$ Zellpopulation beobachtete werden. Hierbei handelte es sich vermutlich um voraktivierte $CD8^+$ T-Zellen oder Gedächtnis-$CD8^+$ T-Zellen innerhalb der OT-1 Population.

Sowohl endogene $CD8^+$ T-Zellen als auch transferierte OT-1-Zellen zeigten hierbei ohne Restimulation eine nur unwesentliche IFN-γ- oder TNF-α-Produktion. Die durch Infektion mit *Salmonellen* generierte Entzündung führte in den vorliegenden Versuchen somit nicht zur TZR-Signal-unabhängigen IFN-γ- oder TNF-α-Produktion der T-Zellen.

Transferierte $CD8^+$ T-Zellen differenzierten, wie zu erwarten, nach Infektion mit L.m.OVA in spezifische $CD8^+$ T-Zellen, die sowohl IFN-γ als auch TNF-α nach SIINFEKL-Peptid-Restimulation produzierten. Hierbei wurde die Anzahl der IFN-γ- und TNF-α-sezernierenden OT-1 T-Zellen zusätzlich durch T-Zellproliferation erhöht (Abb.10). Diese Ergebnisse ließen die Entwicklung einer spezifischen $CD8^+$ T-Zellantwort nach Infektion mit L.m.OVA erkennen.

Nach Infektion mit *S. typhimurium* und Restimulation mit $OVA_{257-364}$-Peptid zeigten endogene $CD8^+$ T-Zellen, wie zu erwarten war, keine Zytokinproduktion, da keine $OVA_{257-264}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in dieser T-Zellpopulation vorhanden waren. Nach Infektion mit virulenten *Salmonellen* produzierten transferierte OT-1 $CD8^+$ T-Zellen kaum IFN-γ, wie die Restimulation mit $OVA_{257-264}$-Peptid zeigte. Im Gegensatz dazu sezernierte nach *S. typhimurium* Infektion ein Großteil der transferierten OT-1 $CD8^+$ T-Zellen nach SIINFEKL-Peptid-Restimulation TNF-α. Nach L.m.OVA-Infektion und nach *S. typhimurium* Infektion wiesen transferierte $CD8^+$ T-Zellen nach Restimulation mit SIINFEKL-Peptid ähnliche Frequenzen $TNF\text{-}\alpha^+$ $CD8^+$ T-Zellen auf. Dieser Unterschied in der Zytokinproduktion war nach SIINFEKL-Peptid-Restimulation bereits in der naiven OT-1 T-Zellpopulation zu erkennen. Ungefähr 20 Prozent der $CD8^+$ T-Zellen sezernierten TNF-α und 10 Prozent der $CD8^+$ T-Zellen IFN-γ.

Ein Großteil der transferierten $CD8^+$ T-Zellen entwickelte sich nach *Salmonellen*-Infektion zu TNF-α-produzierenden, kaum jedoch zu IFN-γ-produzierenden $CD8^+$ T-Zellen, wie nach *in-vitro*- Restimulation mit SIINFEKL-Peptid nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich dazu zeigten nach L.m.OVA-Infektion OT-1 T-Zellen nach *in-vitro*-$OVA_{257-264}$-Peptid-Restimulation, dass für die Induktion von $IFN\text{-}\gamma^+$ $CD8^+$ T-Zellen während der Infektion vermutlich der zusätzliche TZR-spezifische Stimulus notwendig war.

Wie bereits erwähnt, waren auch ohne Infektion Unterschiede in der Zytokinproduktion zu erkennen. Wahrscheinlich handelte es sich bei den Zytokin-sezernierenden $CD8^+$ T-Zellen um Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen, die bereits innerhalb der naiven OT-1-Population vorlagen.

Nach Infektion mit virulenten *Salmonellen* wiesen ein Großteil der transferierten und mit SIINFEKL-Peptid-restimulierten $CD8^+$ T-Zellen eine TNF-α-Produktion auf,

wohingegen die geringe Anzahl der IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen stark abnahm. Eine anhaltende TNF-α-Expression bei gleichzeitig reduzierter Expression weiterer Zytokine konnte bereits in LPS-behandelten C57BL/6- Mäusen nachgewiesen werden (Castro *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse stimmen mit den hier beschriebenen Beobachtungen überein. In der vorliegenden Arbeit markierte die Abwesenheit der IFN-γ-Produktion bei vorhandener TNF-α-Produktion den Unterschied zwischen *S. typhimurium*-Infektion und L.m.OVA-Infektion nach Transfer von OT-1 $CD8^+$ T-Zellen.

In LPS-behandelten Mäusen zeigten neben naiven T-Zellen auch Gedächtnis-T-Zellen eine starke CD69-Expression. In diesen Mäusen wurden nach LPS-Behandlung Gedächtnis $CD8^+$ T-Zellen ($CD44^{high}$) zur Proliferation angeregt (Tough *et al.*, 1997). Im Unterschied dazu konnte in den hier vorliegenden Versuchen nur eine unwesentliche Zunahme in der Anzahl TNF-α^+ $CD8^+$ T-Zellen nach *S. typhimurium*-Infektion im Vergleich zur naiven Kontrolle festgestellt werden. Die Generierung von proliferierenden Effektor-T-Zellen bedarf zusätzlicher Signale, die die TZR-spezifische Aktivierung der T-Zellen mit einschließt. Unabhängig ihrer Spezifität weisen die meisten T-Zellen auch nach Infektion mit L.m. oder LCMV die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf. Auch hier differenzieren nur Antigen-spezifische T-Zellen in Effektor-T-Zellen (Jiang *et al.*, 2003). Ein Grund für die unterschiedliche Zytokinproduktion nach *Salmonellen*-Infektion könnte im Differenzierungsgrad der $CD8^+$ T-Zellen liegen. Hierbei könnten TNF-α-produzierende $CD8^+$ T-Zellen und IFN-γ-produzierende $CD8^+$ T-Zellen zwei unterschiedliche Differenzierungsstadien darstellen. Diese unterschiedlichen Differenzierungsstadien der T-Zellen könnten zudem ineinander übergehen. So könnte die TNF-α Produktion einen ‚steady state'-Zustand (Jiang *et al.*, 2003) der T-Zellen darstellen. Dieser ‚steady state'-Zustand würde es den T-Zellen ermöglichen nach TZR-spezifischem Stimulus schneller in ein IFN-γ-sezernierendes Differenzierungsstadium zu wechseln und zu Effektor-T-Zellen zu differenzieren.

6.2.3 Apoptose-Induktion in CD8$^+$ T-Zellen nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium*

T-Zellen, die nach Aktivierung keine vollständige Differenzierung zu Zytokin-produzierenden Effektor-T-Zellen durchlaufen, werden durch Apoptose eliminiert (Jiang *et al.*, 2003;Zarozinski *et al.*, 2000). So kommt es, dass nach Infektion mit LCMV ein Großteil der CD8$^+$ T-Zellpopulation CD69 exprimiert, aber nur ein Bruchteil dieser Population zu vollständig aktivierten Effektor-T-Zellen heranreift. Die übrigen T-Zellen werden apoptotisch und sterben. Apoptose kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden, so führt unter anderem auch die Bindung von TNF-α an seinen Rezeptor zum Zelltod. Die Bindung von TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) an DR4/5 (Death receptor 4/5) induziert über Signalkaskaden ebenfalls Apoptose in der betroffenen Zelle.

Um die Apoptoserate nach Infektion mit *S. typhimurium* zu messen, wurde das bereits beschriebene murine Transfermodell benutzt. Nach Transfer von TZR-transgenen CD8$^+$ T-Zellen wurden die Rezipienten mit virulenten *Salmonellen* infiziert. Als Positivkontrolle diente hierbei die Inkubation mit Fas-mAk. Die Apoptoserate der CD8$^+$ T-Zellen war nach *S. typhimurium*-Infektion nur unwesentlich höher als nach Infektion mit L.m.OVA. Endogene CD8$^+$ T-Zellen zeigten somit nach Infektion mit *Salmonellen* oder nach Infektion mit L.m.OVA eine ähnliche Apoptoserate. Nach Infektion mit L.m.OVA wiesen transferierte CD8$^+$ T-Zellen im Gegensatz zu transferierte OT-1 T-Zellen aus SL1344 infizierten Mäusen eine deutlich schwächere Apoptoserate auf. Ein Grund für die erhöhte Apoptoserate könnte in der schweren Entzündung liegen, die durch die *Salmonellen*-Infektion hervorgerufen wird. Hierbei könnte eine verstärkte Produktion inflammatorischer Zytokine, z.B. TNF-α, zur Apoptoseinduktion der T-Zellen führen.

Anders als nach L.m.OVA Infektion erfuhren OT-1 T-Zellen nach SL1344 Infektion keinen $OVA_{257-264}$-spezifischen Stimulus und differenzierten nicht zu IFNγ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen. Umgekehrt kann daraus gefolgert werden, dass nur eine spezifische T-Zellrezeptor-abhängige Aktivierung der CD8$^+$ T-Zellen in einem Schutz vor Apoptose mündet. Ein solcher Schutz vor Apoptose wird z. B. intrazellulär durch die anti-apoptotisch wirkenden Mitglieder der Bcl-2-Familie, Bcl-2 und Bcl-xL, vermittelt (Hawkins and Vaux, 1994). Ergebnisse aus anderen Infektionsmodellen bestätigten die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse (Jiang *et al.*, 2003). Auch

Ergebnisse weiterer Untersuchungen, die die Apoptoseinduktion TZR-unspezifisch aktivierter T-Zellen in Mäusen nach LPS-Injektion umfassen (Castro *et al.*, 1998), konnten im hier vorliegenden *Salmonellen*-Infektionsmodell bestätigt werden.

6.2.4 Die Infektion mit virulenten *S. typhimurium* induziert eine Immunsuppression in C57BL/6-Mäusen

Die Infektion mit *S. typhimurium* kann eine Immunsuppression in Mäusen auslösen (MacFarlane *et al.*, 1999). Ein Abwehrmechanismus von Makrophagen gegen die Besiedelung mit Pathogenen besteht u.a. in der Produktion von reaktiven Stickstoff-Oxiden die aus Stickstoffmonoxid (NO) hervorgehen (al Ramadi *et al.*, 1991;De Groote *et al.*, 1995;MacFarlane *et al.*, 1999). Diese und weitere immunsuppressive Substanzen werden nach Infektion mit *Salmonellen* sezerniert und wirken auf umliegende Zellen im Gewebe. Um die suppressive Wirkung virulenter *Salmonellen* auf das Immunsystem zu testen, wurde ein adoptiver Transfer mit CFSE-markierten Milzzellen durchgeführt. Nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* wurde ein für OT-1 T-Zellen spezifischer Stimulus durch subkutan verabreichtes SIINFEKL-Peptid in Adjuvans gesetzt. Nach Infektion mit virulenten *Salmonellen* proliferierten, wie in Abb.17 gezeigt, $CD8^+$ T-Zellen nur mäßig wenn zusätzlich ein spezifischer Stimulus durch SIINFEKL-Peptid erfolgte. Ohne diesen Stimulus zeigten transferierte $CD8^+$ T-Zellen hingegen gar keine Proliferation. Dagegen vermehrten sich transferierte OT-1 $CD8^+$ T-Zellen sehr stark, wenn nur mit $OVA_{257-264}$-Peptid restimuliert wurde und keine Infektion mit *S. typhimurium* nachfolgte. Ferner wurde, verglichen mit SIINFEKL-Peptid stimulierten OT-1 T-Zellen, eine Reduktion der Frequenz transferierten $CD8^+$ T-Zellen nach *Salmonellen*-Infektion und *in-vivo*-SIINFEKL-Peptid Stimulation deutlich. Die hohe Frequenz und die verstärkte Anzahl transferierter $CD8^+$ T-Zellen nach *in-vivo*-$OVA_{257-264}$-Peptid Restimulation bewies die starke Proliferation dieser Zellen.

Die Immunsuppression könnte sich zum einen direkt auf die T-Zellen auswirken und das Proliferieren dieser Zellen verhindern**,** oder zum anderen auf die Antigen-präsentierende Zellen. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass intrazellulär-vorliegende *Salmonellen* die Präsentation von Peptiden durch MHC-Klasse-II-Moleküle unterdrücken, und somit die Proliferation Antigen-spezifischer $CD4^+$ T-

Zellen unterbinden (Cheminay *et al.*, 2005). Weiterhin könnten regulatorische T-Zellen in der Unterdrückung einer Immunantwort nach *Salmonellen*-Infektion eine Rolle spielen (Roncarolo *et al.*, 2006). Eine Immunsuppression könnte darüber hinaus auch ein Grund für die fehlende erworbene Immunantwort in C57BL/6-Mäusen nach Infektion mit virulenten *Salmonellen* sein. Mögliche Mediatoren der Immunsuppression wären z.B. Prostaglandine oder wie bereits beschrieben NO oder die anti-inflammatorischen Zytokine TGF-β und IL-10. Zusätzlich könnte auch IDO (Munn *et al.*, 1999) eine Rolle in der Unterdrückung einer Immunantwort spielen.

6.2.5 Vermittlung der TZR-unspezifischen T-Zellaktivierung

Die Erkennung von LPS, bzw. Lipid-A-Bestandteilen, durch das angeborenen Immunsystems hat eine T-Zellaktivierung zur Folge (Tough *et al.*, 1997), die durch die Expression von CD69 auf der Zelloberfläche charakterisiert ist (Castro *et al.*, 1998). LPS wird nach Bindung an LBP und CD14 durch TLR4 wahrgenommen. Die Aktivierung des TLR4-Rezeptorkomplexes führt zur Signalweiterleitung in das Zellinnere, hierfür ist der zentrale TLR-Adapter MyD88 ein wichtiger Mediator. Die nach Bindung dieser Strukturen induzierten Signalkaskaden führen zur Aktivierung des angeborenen und daraufhin auch zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems. IFN-γ wird früh nach Infektion und darauffolgender Entzündung gebildet und spielt eine zentrale Rolle in der Immunantwort, so auch nach Infektion mit *S. typhimurium*. Es sollte im Folgenden geklärt werden, welche Mediatoren während der starken Entzündung nach Infektion mit *S. typhimurium* für die T-Zellaktivierung und T-Zelldifferenzierung verantwortlich waren. Hierfür wurden C57BL/6-Mäuse, MyD88-defiziente, TLR2+4-defiziente und IFN-γ-Rezeptor-defiziente Mäuse mit virulenten *Salmonellen* infiziert. Wie in Abb. 13 dargestellt, zeigten $CD8^+$ T-Zellen und $CD4^+$ T-Zellen aus *Salmonellen*-infizierten TLR2+4$^{-/-}$-, MyD88$^{-/-}$-Mäusen und aus Wildtyp-Kontrollen eine starke CD69-Expression. Hingegen konnte keine Aktivierung im Sinne einer veränderten L-Selektin-Expression beobachtet werden. Ähnliches galt für IFN-γ-Rezeptor$^{-/-}$-Mäuse, auch hier war eine CD69-Expression der T-Zellen nach Infektion erkennbar. Sowohl $CD4^+$ T-Zellen als auch $CD8^+$ T-Zellen aus IFN-γ-Rezeptor-defizienten Mäusen

zeigten keine veränderte CD62L-Expression nach Infektion mit virulenten *Salmonellen*.

Nach Infektion mit *S. typhimurium* vermittelte die starke Entzündung demnach eine T-Zellaktivierung die unabhängig von TLR2+4, IFN-γ-Rezeptor und auch MyD88 verlief. Welche Faktoren könnten dann für die T-Zellaktivierung im Verlauf der Infektion mit *S. typhimurium* verantwortlich sein? *Salmonellen* können über verschiedene TLR detektiert werden, z.B. erkennen TLR5 und TLR9 *Salmonellen*-Flagellin bzw. bakterielle DNA. Das angeborene Immunsystem kann Mikroorganismen über eine Reihe anderer Strukturerkennungsmoleküle wahrnehmen. Zusätzlich zu den TLR könnten *Salmonellen* daher z.B. über Mannoserezeptoren, Scavengerezeptoren oder über Bindung durch Komponenten des Komplementsystems erkannt werden. Wie unter 6.1.5 bereits erwähnt, sind auch intrazelluläre Rezeptoren an der Erkennung bakterieller Strukturen beteiligt. So können neben RIG-I und MDA5 auch NOD-Proteine, die zur Familie der NLR gehören, mikrobielle Strukturen erkennen. Diese Erkennung führt zur Aktivierung unterschiedlicher Trankriptionsfaktoren, die daraufhin Gene regulieren, die für Entzündungsvermittelnde Chemokine und Zytokine kodieren. Das würde u.a. die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf der Zelloberfläche von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen nach Infektion mit *S typhimurium* erklären

Es konnte gezeigt werden, dass nach Bindung von Typ-I-Interferonen an den Typ-I-Interferon-Rezeptor die Expression von CD69 auf der Oberfläche von T-Zellen induziert wird (Shiow *et al.*, 2006). Zudem wurde postuliert, dass diese CD69-Expression maßgeblich von Typ-I-Interferon-Rezeptor-vermittelten Signalen abhängig ist und ohne IFN-α oder IFN-β-Bindung keine CD69-Expression erfolgt.

Weiterhin konnte nach Infektion mit *L. monozytogenes* oder LCMV eine CD69-Expression auf T-Zellen beobachtete werden (Carrero *et al.*, 2004;Jiang *et al.*, 2003;Tough *et al.*, 1997). Diese T-Zellaktivierung verläuft unabhängig von der Spezifität der T-Zellen. In diesen Infektionsmodellen kann zudem eine erhöhte Apoptoserate der aktivierten T-Zellen beobachtet werden (Jiang *et al.*, 2003). Hierbei scheinen ebenfalls Typ-I-Interferone eine entscheidende Rolle zu spielen (Carrero *et al.*, 2004). Versuche die nach *Salmonellen*-Infektion den Einfluss von Typ-I-Interferonen auf die T-Zellaktivierung und -differenzierung analysieren, werden zurzeit durchgeführt.

6.2.6 Schlussfolgerung und Aussicht

Die Infektion mit *S. typhimurium* ruft in Mäusen eine schwere Entzündung von Milz und Leber hervor. Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit diese Entzündung Einfluß auf die T-Zellaktivierung und -differenzierung nimmt. Dazu wurde die T-Zellantwort sowohl phänotypisch als auch in ihrer Funktion analysiert und zusätzlich die Rate an Apoptoseinduktion bestimmt.

Es konnte bereits im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach Infektion mit virulenten *S. typhimurium* keine $CD8^+$ T-Zellproliferation stattfindet (Mittrücker, unpublizierte Daten). Die durch *Salmonellen*-Infektion hervorgerufene Entzündung nahm Einfluß auf die Funktion der T-Zellen. Naive T-Zellen wurden im Rahmen der Entzündung aktiviert, wie die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 zeigte. Gleichzeitig wiesen naive T-Zellen in den ersten Tagen nach *Salmonellen*-Infektion eine erhöhte Apoptoserate auf. Die Aktivierung fand hierbei unabhängig von TLR4, TLR2, IFN-γ-Rezeptor und MyD88 statt. Nach Infektion mit *S. typhimurium* wurden TNF-α-sezernierende jedoch keine IFN-γ-sezernierende $CD8^+$ T-Zellen generiert. Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass nach Infektion mit *Salmonellen* die Funktion der $CD8^+$ T-Zellen unterdrückt wurde. Daraus folgt, dass die Infektion mit attenuierten *Salmonellen* (MacFarlane *et al.*, 1999) aber auch mit virulenten *Salmonellen* eine Immunsuppression auslösen kann. Es konnte hingegen nicht geklärt werden, welche Mechanismen die unspezifische $CD8^+$ T-Zellantwort nach *S. typhimurium*-Infektion auslösen. Diese Fragstellung wird zurzeit in weiterführenden Experimenten untersucht.

Die Infektion mit *Salmonellen* induzierte einerseits eine massive Entzündung in deren Folge inflammatorische Zytokine in großen Mengen sezerniert wurden (Zytokinsturm). Hierdurch konnten auch Antigen-unerfahrene T-Zellen, d.h. T-Zellen vor der primären Immunisierung, TNF-α produzieren. Andererseits wurde eine Immunsuppression induziert in der z.B. die T-Zellproliferation reduziert und die Funktion der T-Zellen deutlich eingeschränkt war. Diese Situation ist für Mikroorganismen von Vorteil, da durch die Immunsuppression eine stärkere Vermehrung und eine längere Persistenz der Pathogene ermöglicht wird. Die Infektion mit *S. typhimurium* hat für das Immunsystem der Maus entscheidende Konsequenzen. Die starke Entzündung kann durch eine übermäßige Sezernierung inflammatorischer Zytokine im schlimmsten Fall zum Multiorganversagen und

toxischen Schock führen. TNF-α und IL-1 nehmen hierbei eine wichtige Funktion ein. Als Konsequenz der starken Aktivierung und erhöhten Apoptoserate verringert sich der für eine primäre Immunisierung zur Verfügung stehende T-Zellpool. Zusätzlich tritt eine Immunsuppression auf, die eine erworbene Immunantwort zeitweilig unterbindet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die nach *Salmonellen*-Infektion hervorgerufene Entzündung einen deutlichen Einfluss auf die T-Zellantwort hat. Hierbei wurde deutlich, dass $CD8^+$ T-Zellen aktiviert werden können. Zudem erfolgt nach TZR-spezifischem Stimulus die Differenzierung in TNF-α-sezernierende $CD8^+$ T-Zellen. Es wurde jedoch keine Differenzierung in IFN-γ^+ $CD8^+$ T-Zellen ausgelöst, wie durch TZR-spezifische Restimulation nachgewiesen werden konnte.

7 Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems auf die Ausbildung der adaptiven Immunantwort untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass weder TLR4 noch TLR2 oder der zentrale TLR-Adapter MyD88 für die Entstehung einer humoralen oder zellulären, erworbenen Immunantwort nach *S. typhimurium*-Infektion notwendig sind.

Die untersuchten TLR2+4-, TLR2-, TLR4- und MyD88-defizienten Mäuse konnten eine Infektion mit *S. typhimurium* kontrollieren. Eine ungehemmte Vermehrung der Pathogene in Milz und Leber wurde zwar unterbunden, aber die Bakterientiter verblieben in TLR2+4- und MyD88-defizienten Mäusen für längere Zeit auf höherem Niveau als in Wildtyp-Mäusen. Obwohl auch diese Tiere T-Zell- und Antikörperantworten generierten, wurden die *Salmonellen* nicht vollständig geklärt. Das deutet daraufhin, dass entweder die Qualität der B- und T-Zellantworten, im Vergleich zu Kontrolltieren, beeinträchtigt ist, oder dass weitere T- und B-Zell-unabhängige aber TLR- bzw. MyD88-abhängige Mechanismen an der Eradikation der Salmonellen beteiligt sind.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die nach *Salmonellen*-Infektion hervorgerufene schwere Entzündung Einfluß auf die Aktivierung naiver T-Zellen hat. Die phänotypische Charakterisierung und eine Analyse der T-Zellfunktion ergaben, dass naive T-Zellen im Rahmen der Entzündung aktiviert wurden. Dies konnte anhand der Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen gezeigt werden. Diese Aktivierung fand unabhängig von TLR2, TLR4, IFN-γ-Rezeptor und MyD88 statt.

Gleichzeitig wiesen T-Zellen in den ersten Tagen nach *Salmonellen*-Infektion eine vermutlich durch TZR-unspezifische Aktivierung hervorgerufene, erhöhte Apoptoserate auf. Es konnte zudem gezeigt werden, dass nach Infektion mit *Salmonellen* die Funktion der $CD8^+$ T-Zellen unterdrückt wurde. Insgesamt zeigen unsere Analysen, dass die Infektion mit virulenten *Salmonellen* zwar aktivierend auf die T-Zellen aber letztendlich suppressiv auf die T-Zellantwort wirkt.

8 Summary

In the first part of the present study the influence of receptors of the innate immune system on the development of the adaptive immune response was analyzed. It could be shown that neither TLR4 nor TLR2 or the central TLR-adapter MyD88 were necessary for the development of the humoral and cellular adaptive immune response after *Salmonella typhimurium* infection.

TLR2+4-, TLR2-, TLR4- and MyD88-deficient mice were able to control infection with *S. typhimurium.* Unrestricted bacterial replication in spleen and liver was prevented, but in TLR2+4$^{-/-}$ mice and MyD88$^{-/-}$ mice bacterial titre persisted longer and prevailed at a higher level compared to wild-type controls. This could point to a diminished quality of T and B cell response in these mutant mice compared to C57BL/6 mice. Furthermore, T cell- and B cell-independent but TLR2+4- or MyD88-dependent mechanisms might be involved in bacterial eradication.

In the second part of the study it was shown that severe inflammation caused by virulent *S. typhimurium* infection influences the activation of naïve T cells. A phenotypic analysis and the analysis of T cell function demonstrated that naïve T cells were activated during inflammation. This could be shown by means of surface expression of the immediate early activation marker CD69 on CD4^{+} and CD8^{+} T cells. This T cell activation appeared independent of TLR2, TLR4, IFN-γ receptor signalling and MyD88. At the same time these activated T cells displayed an increased apoptosis rate, presumably due to TCR-independent activation. In addition it could be shown that during *Salmonella*-infection CD8^{+} T cell function was repressed. Our results indicate that infection with virulent *S. typhimurium* activate T cells but repress T cell response at the same time.

9 Literaturverzeichnis

Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* **9:** 143-150.

Aderem, A. and Underhill, D. M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17:** 593-623.

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J., and Gurney, A. L. (2003) Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* **278:** 1910-1914.

al Ramadi, B. K., Brodkin, M. A., Mosser, D. M., and Eisenstein, T. K. (1991) Immunosuppression induced by attenuated Salmonella. Evidence for mediation by macrophage precursors. *J Immunol* **146:** 2737-2746.

Apostolopoulos, V. and McKenzie, I. F. (2001) Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr Mol Med* **1:** 469-474.

Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* **15:** 675-705.

Beutler, B., Jiang, Z., Georgel, P., Crozat, K., Croker, B., Rutschmann, S., Du, X., and Hoebe, K. (2006) Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* **24:** 353-389.

Bolz, D. D., Sundsbak, R. S., Ma, Y., Akira, S., Kirschning, C. J., Zachary, J. F., Weis, J. H., and Weis, J. J. (2004) MyD88 plays a unique role in host defense but not arthritis development in Lyme disease. *J Immunol* **173:** 2003-2010.

Bonizzi, G. and Karin, M. (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25:** 280-288.

Bossink, A. W., Paemen, L., Jansen, P. M., Hack, C. E., Thijs, L. G., and Van Damme, J. (1995) Plasma levels of the chemokines monocyte chemotactic proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis. *Blood* **86:** 3841-3847.

Brown, A. and Hormaeche, C. E. (1989) The antibody response to salmonellae in mice and humans studied by immunoblots and ELISA. *Microb Pathog* **6:** 445-454.

Brown, G. D. (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6:** 33-43.

Busch, D. H., Pilip, I. M., Vijh, S., and Pamer, E. G. (1998) Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* **8:** 353-362.

Campbell, D. J., Kim, C. H., and Butcher, E. C. (2003) Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol Rev* **195:** 58-71.

Carrero, J. A., Calderon, B., and Unanue, E. R. (2004) Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to Listeria infection. *J Exp Med* **200:** 535-540.

Castellino, F., Huang, A. Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., and Germain, R. N. (2006) Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **440:** 890-895.

Castro, A., Bemer, V., Nobrega, A., Coutinho, A., and Truffa-Bachi, P. (1998) Administration to mouse of endotoxin from gram-negative bacteria leads to activation and apoptosis of T lymphocytes. *Eur J Immunol* **28:** 488-495.

Cerwenka, A. and Lanier, L. L. (2001) Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* **1:** 41-49.

Chander, R., Sainis, K. B., and Lewis, N. F. (1986) Role of thymus-derived lymphocytes in acquired immunity to salmonellosis in mice. *Microbiol Immunol* **30:** 1299-1306.

Cheminay, C., Chakravortty, D., and Hensel, M. (2004) Role of neutrophils in murine salmonellosis. *Infect Immun* **72:** 468-477.

Cheminay, C., Mohlenbrink, A., and Hensel, M. (2005) Intracellular Salmonella inhibit antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* **174:** 2892-2899.

Conlan, J. W. (1997) Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, and Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* **65:** 630-635.

Conlan, J. W. and North, R. J. (1992) Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria Listeria monocytogenes, Francisella tularensis, and Salmonella typhimurium involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect Immun* **60:** 5164-5171.

Cummings, L. A., Barrett, S. L., Wilkerson, W. D., Fellnerova, I., and Cookson, B. T. (2005) FliC-specific CD4+ T cell responses are restricted by bacterial regulation of antigen expression. *J Immunol* **174:** 7929-7938.

De Groote, M. A., Granger, D., Xu, Y., Campbell, G., Prince, R., and Fang, F. C. (1995) Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a Salmonella typhimurium model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 6399-6403.

Delale, T., Paquin, A., Asselin-Paturel, C., Dalod, M., Brizard, G., Bates, E. E., Kastner, P., Chan, S., Akira, S., Vicari, A., Biron, C. A., Trinchieri, G., and Briere, F. (2005) MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *J Immunol* **175:** 6723-6732.

Depaolo, R. W., Lathan, R., Rollins, B. J., and Karpus, W. J. (2005) The chemokine CCL2 is required for control of murine gastric Salmonella enterica infection. *Infect Immun* **73:** 6514-6522.

Doyle, S. L. and O'neill, L. A. (2006) Toll-like receptors: From the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* **72:** 1102-1113.

Eisenstein, T. K., Killar, L. M., and Sultzer, B. M. (1984) Immunity to infection with Salmonella typhimurium: mouse-strain differences in vaccine- and serum-mediated protection. *J Infect Dis* **150:** 425-435.

Feuillet, V., Medjane, S., Mondor, I., Demaria, O., Pagni, P. P., Galan, J. E., Flavell, R. A., and Alexopoulou, L. (2006) Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103:** 12487-12492.

Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G., and Heffron, F. (1986) Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83:** 5189-5193.

Freeman, J. A., Ohl, M. E., and Miller, S. I. (2003) The Salmonella enterica serovar typhimurium translocated effectors SseJ and SifB are targeted to the Salmonella-containing vacuole. *Infect Immun* **71:** 418-427.

Galan, J. E. and Curtiss, R., III (1991) Distribution of the invA, -B, -C, and -D genes of Salmonella typhimurium among other Salmonella serovars: invA mutants of Salmonella typhi are deficient for entry into mammalian cells. *Infect Immun* **59:** 2901-2908.

Germain, R. N. and Stefanova, I. (1999) The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol* **17:** 467-522.

Gordon, S. (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111:** 927-930.

Groothuis, T. A., Griekspoor, A. C., Neijssen, J. J., Herberts, C. A., and Neefjes, J. J. (2005) MHC class I alleles and their exploration of the antigen-processing machinery. *Immunol Rev* **207:** 60-76.

Gulig, P. A., Doyle, T. J., Clare-Salzler, M. J., Maiese, R. L., and Matsui, H. (1997) Systemic infection of mice by wild-type but not Spv- Salmonella typhimurium is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* **65:** 5191-5197.

Haring, J. S., Badovinac, V. P., and Harty, J. T. (2006) Inflaming the CD8+ T cell response. *Immunity* **25:** 19-29.

Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6:** 1123-1132.

Hawkins, C. J. and Vaux, D. L. (1994) Analysis of the role of bcl-2 in apoptosis. *Immunol Rev* **142:** 127-139.

Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410:** 1099-1103.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408:** 740-745.

Hess, J., Ladel, C., Miko, D., and Kaufmann, S. H. (1996) Salmonella typhimurium aroA- infection in gene-targeted immunodeficient mice: major role of CD4+ TCR-alpha beta cells and IFN-gamma in bacterial clearance independent of intracellular location. *J Immunol* **156:** 3321-3326.

Hoiseth, S. K. and Stocker, B. A. (1981) Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291:** 238-239.

Hsing, L. C. and Rudensky, A. Y. (2005) The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* **207:** 229-241.

Jabado, N., Cuellar-Mata, P., Grinstein, S., and Gros, P. (2003) Iron chelators modulate the fusogenic properties of Salmonella-containing phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 6127-6132.

Jacobs, H. and Bross, L. (2001) Towards an understanding of somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* **13:** 208-218.

Jankovic, D., Sher, A., and Yap, G. (2001) Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. *Curr Opin Immunol* **13:** 403-409.

Jiang, J., Lau, L. L., and Shen, H. (2003) Selective depletion of nonspecific T cells during the early stage of immune responses to infection. *J Immunol* **171:** 4352-4358.

Kasper, B., Brandt, E., Bulfone-Paus, S., and Petersen, F. (2004) Platelet factor 4 (PF-4)-induced neutrophil adhesion is controlled by src-kinases, whereas PF-4-mediated exocytosis requires the additional activation of p38 MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood* **103:** 1602-1610.

Kawai, T. and Akira, S. (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* **13:** 816-825.

Kolls, J. K. and Linden, A. (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **21:** 467-476.

Kursar, M., Mittrucker, H. W., Koch, M., Kohler, A., Herma, M., and Kaufmann, S. H. (2004) Protective T cell response against intracellular pathogens in the absence of Toll-like receptor signaling via myeloid differentiation factor 88. *Int Immunol* **16:** 415-421.

Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., and Cua, D. J. (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201:** 233-240.

Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2001) Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* **106:** 263-266.

Laroux, F. S., Romero, X., Wetzler, L., Engel, P., and Terhorst, C. (2005) Cutting edge: MyD88 controls phagocyte NADPH oxidase function and killing of gram-negative bacteria. *J Immunol* **175:** 5596-5600.

Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1995) A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the Drosophila host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 9465-9469.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* **86:** 973-983.

Liu, N., Montgomery, R. R., Barthold, S. W., and Bockenstedt, L. K. (2004) Myeloid differentiation antigen 88 deficiency impairs pathogen clearance but does not alter inflammation in Borrelia burgdorferi-infected mice. *Infect Immun* **72:** 3195-3203.

Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V., and Gilliet, M. (2001) Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* **2:** 585-589.

Lo, W. F., Ong, H., Metcalf, E. S., and Soloski, M. J. (1999) T cell responses to Gram-negative intracellular bacterial pathogens: a role for CD8+ T cells in immunity to Salmonella infection and the involvement of MHC class Ib molecules. *J Immunol* **162:** 5398-5406.

Lord, S. J., Rajotte, R. V., Korbutt, G. S., and Bleackley, R. C. (2003) Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev* **193:** 31-38.

Lyons, A. B. and Parish, C. R. (1994) Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* **171:** 131-137.

MacFarlane, A. S., Schwacha, M. G., and Eisenstein, T. K. (1999) In vivo blockage of nitric oxide with aminoguanidine inhibits immunosuppression induced by an attenuated strain of Salmonella typhimurium, potentiates Salmonella infection, and inhibits macrophage and polymorphonuclear leukocyte influx into the spleen. *Infect Immun* **67:** 891-898.

Mastroeni, P., Clare, S., Khan, S., Harrison, J. A., Hormaeche, C. E., Okamura, H., Kurimoto, M., and Dougan, G. (1999) Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent Salmonella typhimurium. *Infect Immun* **67:** 478-483.

Mastroeni, P., Harrison, J. A., Chabalgoity, J. A., and Hormaeche, C. E. (1996) Effect of interleukin 12 neutralization on host resistance and gamma interferon production in mouse typhoid. *Infect Immun* **64:** 189-196.

Mastroeni, P., Skepper, J. N., and Hormaeche, C. E. (1995) Effect of anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on histopathology of primary Salmonella infections. *Infect Immun* **63:** 3674-3682.

Mastroeni, P., Villarreal-Ramos, B., and Hormaeche, C. E. (1992) Role of T cells, TNF alpha and IFN gamma in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated aro- Salmonella vaccines. *Microb Pathog* **13:** 477-491.

McGreal, E. P., Miller, J. L., and Gordon, S. (2005) Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol* **17:** 18-24.

McKenzie, S. E. and Schreiber, A. D. (1998) Fc gamma receptors in phagocytes. *Curr Opin Hematol* **5:** 16-21.

McSorley, S. J., Cookson, B. T., and Jenkins, M. K. (2000) Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with Salmonella typhimurium. *J Immunol* **164:** 986-993.

Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr. (2000) The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* **8:** 452-456.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388:** 394-397.

Mellman, I. and Steinman, R. M. (2001) Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106:** 255-258.

Menten, P., Proost, P., Struyf, S., Van Coillie, E., Put, W., Lenaerts, J. P., Conings, R., Jaspar, J. M., De Groote, D., Billiau, A., Opdenakker, G., and Van Damme, J. (1999) Differential induction of monocyte chemotactic protein-3 in mononuclear leukocytes and fibroblasts by interferon-alpha/beta and interferon-gamma reveals MCP-3 heterogeneity. *Eur J Immunol* **29:** 678-685.

Miao, E. A., Scherer, C. A., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G., Baumler, A. J., and Miller, S. I. (1999) Salmonella typhimurium leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol* **34:** 850-864.

Mittrucker, H. W. and Kaufmann, S. H. (2000) Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice. *J Leukoc Biol* **67:** 457-463.

Mittrucker, H. W., Kohler, A., and Kaufmann, S. H. (2000) Substantial in vivo proliferation of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes during secondary Listeria monocytogenes infection. *Eur J Immunol* **30:** 1053-1059.

Mittrucker, H. W., Kohler, A., and Kaufmann, S. H. (2002) Characterization of the murine T-lymphocyte response to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* **70:** 199-203.

Mittrucker, H. W., Kohler, A., Mak, T. W., and Kaufmann, S. H. (1999) Critical role of CD28 in protective immunity against Salmonella typhimurium. *J Immunol* **163:** 6769-6776.

Mittrucker, H. W., Raupach, B., Kohler, A., and Kaufmann, S. H. (2000) Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against Salmonella typhimurium infection. *J Immunol* **164:** 1648-1652.

Monack, D. M., Mueller, A., and Falkow, S. (2004) Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* **2:** 747-765.

Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7:** 145-173.

Mosmann, T. R., Li, L., and Sad, S. (1997) Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol* **9:** 87-92.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1:** 263-273.

Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A. L. (1999) Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* **189:** 1363-1372.

Murphy, K. M. and Reiner, S. L. (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* **2:** 933-944.

Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6:** 173-182.

Nauciel, C. (1990) Role of CD4+ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to Salmonella typhimurium infection. *J Immunol* **145:** 1265-1269.

Nauciel, C. and Espinasse-Maes, F. (1992) Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to Salmonella typhimurium infection. *Infect Immun* **60:** 450-454.

Neurath, M. F., Finotto, S., and Glimcher, L. H. (2002) The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* **8:** 567-573.

O'Brien, A. D., Rosenstreich, D. L., and Taylor, B. A. (1980) Control of natural resistance to Salmonella typhimurium and Leishmania donovani in mice by closely linked but distinct genetic loci. *Nature* **287:** 440-442.

Oltz, E. M. (2001) Regulation of antigen receptor gene assembly in lymphocytes. *Immunol Res* **23:** 121-133.

Orange, J. S. and Ballas, Z. K. (2006) Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* **118:** 1-10.

Orlinick, J. R., Vaishnaw, A. K., and Elkon, K. B. (1999) Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int Rev Immunol* **18:** 293-308.

Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C. G., Qi, C. F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H. C., III, Liu, C., Schwartzberg, P. L., and Leonard, W. J. (2002) A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* **298:** 1630-1634.

Pasare, C. and Medzhitov, R. (2005) Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* **438:** 364-368.

Patel, J. C. and Galan, J. E. (2005) Manipulation of the host actin cytoskeleton by Salmonella--all in the name of entry. *Curr Opin Microbiol* **8:** 10-15.

Podack, E. R. (1995) Functional significance of two cytolytic pathways of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol* **57:** 548-552.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282:** 2085-2088.

Rajewsky, K. (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381:** 751-758.

Raupach, B., Kurth, N., Pfeffer, K., and Kaufmann, S. H. (2003) Salmonella typhimurium strains carrying independent mutations display similar virulence phenotypes yet are controlled by distinct host defense mechanisms. *J Immunol* **170:** 6133-6140.

Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M. K. (2006) Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* **212:** 28-50.

Rossi, D. and Zlotnik, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18:** 217-242.

Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006) Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* **212:** 8-27.

Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **2:** 947-950.

Seiler, P., Aichele, P., Raupach, B., Odermatt, B., Steinhoff, U., and Kaufmann, S. H. (2000) Rapid neutrophil response controls fast-replicating intracellular bacteria but not slow-replicating Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* **181:** 671-680.

Shiow, L. R., Rosen, D. B., Brdickova, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L. L., Cyster, J. G., and Matloubian, M. (2006) CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* **440:** 540-544.

Sinha, K., Mastroeni, P., Harrison, J., de Hormaeche, R. D., and Hormaeche, C. E. (1997) Salmonella typhimurium aroA, htrA, and aroD htrA mutants cause progressive infections in athymic (nu/nu) BALB/c mice. *Infect Immun* **65:** 1566-1569.

Stebbins, C. E. and Galan, J. E. (2001) Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* **412:** 701-705.

Stein, M. A., Leung, K. Y., Zwick, M., Garcia-del Portillo, F., and Finlay, B. B. (1996) Identification of a Salmonella virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol Microbiol* **20:** 151-164.

Stockinger, B., Bourgeois, C., and Kassiotis, G. (2006) CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis. *Immunol Rev* **211:** 39-48.

Sutmuller, R. P., den Brok, M. H., Kramer, M., Bennink, E. J., Toonen, L. W., Kullberg, B. J., Joosten, L. A., Akira, S., Netea, M. G., and Adema, G. J. (2006) Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* **116:** 485-494.

Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21:** 335-376.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11:** 443-451.

Ting, J. P., Kastner, D. L., and Hoffman, H. M. (2006) CATERPILLERs, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol* **6:** 183-195.

Tite, J. P., Dougan, G., and Chatfield, S. N. (1991) The involvement of tumor necrosis factor in immunity to Salmonella infection. *J Immunol* **147:** 3161-3164.

Tough, D. F., Sun, S., and Sprent, J. (1997) T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med* **185:** 2089-2094.

Underhill, D. M. and Ozinsky, A. (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* **20:** 825-852.

Vassiloyanakopoulos, A. P., Okamoto, S., and Fierer, J. (1998) The crucial role of polymorphonuclear leukocytes in resistance to Salmonella dublin infections in genetically susceptible and resistant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 7676-7681.

Vidal, S., Tremblay, M. L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiani, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S., and Gros, P. (1995) The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J Exp Med* **182:** 655-666.

Villadangos, J. A. (2001) Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol* **38:** 329-346.

Viret, C. and Janeway, C. A., Jr. (1999) MHC and T cell development. *Rev Immunogenet* **1:** 91-104.

Walz, A., Burgener, R., Car, B., Baggiolini, M., Kunkel, S. L., and Strieter, R. M. (1991) Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8. *J Exp Med* **174:** 1355-1362.

Watts, C. and Powis, S. (1999) Pathways of antigen processing and presentation. *Rev Immunogenet* **1:** 60-74.

Weiss, D. S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S., and Zychlinsky, A. (2004) Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J Immunol* **172:** 4463-4469.

Wurster, A. L., Rodgers, V. L., Satoskar, A. R., Whitters, M. J., Young, D. A., Collins, M., and Grusby, M. J. (2002) Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. *J Exp Med* **196:** 969-977.

Young, L. H., Klavinskis, L. S., Oldstone, M. B., and Young, J. D. (1989) In vivo expression of perforin by CD8+ lymphocytes during an acute viral infection. *J Exp Med* **169:** 2159-2171.

Zarozinski, C. C., McNally, J. M., Lohman, B. L., Daniels, K. A., and Welsh, R. M. (2000) Bystander sensitization to activation-induced cell death as a mechanism of virus-induced immune suppression. *J Virol* **74:** 3650-3658.

Ziegler, S. F., Ramsdell, F., and Alderson, M. R. (1994) The activation antigen CD69. *Stem Cells* **12:** 456-465.

Zlotnik, A. and Yoshie, O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12:** 121-127.

10 Anhang

10.1 Herstellernachweis

Zulieferer	Anschrift	Internet
Adobe Systems GmbH	Ohmstrasse 1 D-85716 Unterschleißheim	www.adobe.de
Agilent Technologies Deutschland GmbH	Herrenbergerstrasse 130 D-71034 Böblingen	www.agilent.com
Amersham Biosciences Europe GmbH	Munzinger Strasse 9 D-79111 Freiburg	www. amershambiosciences. com
Applied Biosystems	Division Headquarters 850 Lincoln Centre Drive Foster City, CA 94404 USA	www.appliedbiosystems. com
B.Braun Melsungen AG	Carl-Braun-Straße 1 D-34212 Melsungen	www.bbraun.de
Binder	Im Mittleren Ösch 5 D-78532 Tuttlingen	www.binder-world.com
Biochrom Labs, Inc.	1719 South 13th Street P.O. Box 996 Terre Haute, IN 47808 USA	www.biochrom.com

Zulieferer	**Anschrift**	**Internet**
Becton Dickinson BD Biosciences: BD Pharmingen BD Difco	BD Biosciences 2350 Qume Drive San Jose, CA USA 95131 877.232.8995	www.bdbiosciences.com
Carl Roth GmbH & Co. KG	Schoemperlenstrasse 1-5 D-76185 Karlsruhe	www.carl-roth.de
Carl Zeiss AG	Democenter Berlin Rankestrasse 26 D-10789 Berlin	www.zeiss.de
Corel Corporation	Edisonstrasse 6 D-85716 Unterschleissheim	www.corel.com
De Novo Software	64 McClintock Crescent Thornhill, Ontario L4J 2T1 Canada	www.denovosoftware.com
Eppendorf	Barkhausenweg 1 D-22339 Hamburg	www.eppendorf.com
Graph Pad Software, Inc.	11452 El Camino Real, #215 San Diego, CA 92130 USA	www.graphpad.com
Heraeus Instruments	Kendro Laboratory Products GmbH Robert-Bosch-Strasse 1 D-63505 Langenselbold	www.heraeus-instruments.de

Zulieferer	Anschrift	Internet
ICN Biomedicals GmbH.	Thüringer Strasse15 D-37269 Eschwege	www.icnbiomed.com
IKA Labortechnik IKA-Werke GmbH & Co. KG	Janke & Kunkel-Strasse 10 D-79219 Staufen	www.ika.net
Invitrogen GmbH: -Invitrogen -NOVEX -Gibco	Technologiepark Karlsruhe Emmy-Noether-Strasse 10 D-76131 Karlsruhe	www.invitrogen.com
Jerini AG	Invalidenstrasse 130 D-10115 Berlin	www.jerini.com
Leica Microsystems AG	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Lilienthalstrasse 39-45 D-64625 Bensheim	www.leica-microstystems.com
Merck	Frankfurter Strasse 250 D-64293 Darmstadt	www.merck.de
Millipore GmbH	Am Kronberger Hang 5 D-65824 Schwalbach	www.millipore.de

Zulieferer	**Anschrift**	**Internet**
Miltenyi Biotech GmbH,	Miltenyi Biotec GmbH, Headquarters Friedrich-Ebert-Straße 68 D-51429 Bergisch Gladbach	www.miltenyibiotec.com
Molecular Devices GmbH	Gutenbergstrasse 10 D-85737 Ismaning/München	www.moleculardevices.com
Molecular Probes Europe BV	Poortgebouw Rijnsburgerweg 10 2333 AA Leiden The Netherlands	www.probes.com
Nunc GmbH und Co.KG	Hagenauer Straße 21A D-65203 Wiesbaden	www.nuncbrand.com
Olympus Deutschland GmbH	Wendenstrasse 14-18 D-20097 Hamburg	www.olympus.de
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Am Wöllerspfad 4 97922 Lauda-Königshofen	www.marienfeld-superior.com
QIAGEN GmbH	QIAGEN Strasse 1 D-40724 Hilden	www.qiagen.com
Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science	Sandhofer Strasse 116 D-68305 Mannheim	www.roche-applied-science.com

Zulieferer	**Anschrift**	**Internet**
Sakura Finetek Europe B.V.	Hoge Rijndijk 48a, 2382 AT Zoeterwoude 2380 AA Zoeterwoude The Netherlands	www.sakuraeu.com
Scientific Software Group	P.O. Box 708188 Sandy, Utah 84070 USA	www.scisoftware.com
SERVA Electrophoresis GmbH	Carl-Benz-Str. 7 P.O.B. 10 52 60 D-69115 Heidelberg	www.serva.de
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Eschenstrasse 5 D-82024 Taufkirchen bei München	www.sigmaaldrich.com

10.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Stefan Kaufmann für die Möglichkeit bedanken am MPI für Infektionsbiologie meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen.
Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker danke ich für die Betreuung und für das engagierte und kritische Korrekturlesen dieser Doktorarbeit.
Ein besonderer Dank gilt Prof. Roland Lauster für die externe Betreuung und die Begutachtung der Arbeit.
Herrn Prof. Wiedemann und Frau Mascow danke ich für die liebe Betreuung und die finanzielle Unterstützung durch das Graduiertenkolleg (GRK) 276/3.

Miso Kursar und Markus Koch gilt mein herzlicher Dank für Rat, Tat und Begeisterung für die Immunologie. Ausserdem bedanke ich mich bei Anne, Peggy und Doris für hervorragende technische Unterstützung und Hilfe bei diversen Experimenten. Ein dickes Dankeschön geht an die Tierpfleger für die Versorgung mit und der Betreuung von den vielen Mäusen.
Des weiteren danke ich Nathalie Jaenner, Thorsten Joeris, Christiane Desel und Martin Beisiegel für Denkhilfen, Motivation und Tipps, nicht nur im Labor. Danke für die viele Unterstützung und eine superschöne Zeit auch ausserhalb des Institutes!
An dieser Stelle natürlich auch ein Merci an alle Mitglieder der Abteilung Immunologie die ein Arbeiten in dieser motivierenden Atmosphäre möglich machen.

Für ein offenes Ohr, interessierte Fragen und treue Freundschaft möchte ich mich ausserdem bei Christiane Proll und Manuel Voss bedanken.

Ganz besonders großer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, die mir in manch schwarzer Stunde geholfen haben. Eure Geduld, euer Verständnis und euer Wille zur Unterstützung haben mir diese Arbeit erst ermöglicht.

10.3Lebenslauf

Persönliche Daten:

Sabine Seibert

geboren am 17. 1. 1977 in München / Deutschland

Ausbildung:

09/87 – 05/96 **Allgemeine Hochschulreife**
Klenze-Gymnasium München
Note: 2,6

09/97 – 07/99 **Grundstudium der Biologie**
Johann Wolfgang Goethe Universität
Frankfurt am Main
Abschluss: Vordiplom
Note: 1,5

09/99 – 09/01 **Hauptstudium der Biologie**
Philipps Universität / Marburg an der Lahn
Abschluss: Diplomprüfung
Fächer: -Entwicklungsbiologie und Parasitologie,
-Zellbiologie und Botanik
-Virologie kombiniert mit Medizinische Mikrobiologie
Note: 1,2

09/01 – 09/02 **Diplomarbeit**
Philipps Universität / Marburg an der Lahn
Titel: “pUL50 des humanen Cytomegalievirus:
ein potentielles Protein der inneren Kernmembran“
Fachbereich Virologie
Abschluss: Diplom-Biologin
Gesamtbewertung: Sehr gut

02/03 – 11/06	**Promotion** Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie / Berlin Abt. Immunologie Prof. Dr. S.H.E. Kaufmann Titel: "T-Zellantwort nach *Salmonella typhimurium*-Infektion im Mausmodell"
01/07	**Verteidigung der Promotionsarbeit** an der Technischen Universität Berlin Gesamtbewertung: magna cum laude

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in Teilen durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) finanziert: Graduiertenkolleg 276/3
„ Signalerkennung und -umsetzung"

Berlin, den