

Modulation immunologischer Funktionen
Dendritischer Zellen durch *Yersinia enterocolitica*
in vivo

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Tanja Rebecca Linzer

aus Ruit/Ostfildern

Tübingen

2011

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. J. Tomiuk

für

Damir & Damijan-Luka & Mama

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Dendritische Zellen (DCs)	1
1.1.1 Funktion der DCs	1
1.1.2 Vorkommen und Unterteilung von DCs in der Maus	1
1.1.3 Entwicklung und Rekrutierung von DCs	3
1.1.4 Antigenerkennung und Antigenaufnahme durch DCs	4
1.1.5 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation von DCs	5
1.1.6 Maturation von DCs	5
1.1.7 T-Zell-DC-Interaktion.....	7
1.2 <i>Yersinia enterocolitica</i>	9
1.2.1 Allgemeines.....	9
1.2.2 Eigenschaften	9
1.2.3 Vorkommen und Verbreitung	10
1.2.4 Klinische Bild der Yersinien-Infektion	10
1.2.6 Pathogenese der Infektion	11
1.2.5 Virulenzfaktoren	12
1.2.6 <i>Yersinia</i> outer protein P.....	16
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	17
2 Material	20
2.1 Versuchstiere	20
2.2 Bakterienstämme	21
2.3 Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.4 Medien und Puffer	23
2.5 Antikörper	25
2.6 Kitsysteme.....	27
2.7 Geräte	28
2.8 Plastik- und Verbrauchsmaterialien.....	29
2.9 Software	30
3 Methoden.....	31

3.1 Kultivierung von Bakterien.....	31
3.2 Verdünnungsreihen von Bakteriensuspensionen	31
3.3 Infektion von Mäusen	32
3.4 Untersuchung der Milz	32
3.5 Isolierung von Leukozyten aus Milz, Knochenmark und Blut	32
3.5.1 Isolierung von Splenozyten	32
3.5.2 Isolierung von Knochenmarkszellen.....	33
3.5.3 Isolierung von Blutzellen	33
3.5.4 Zellzahlbestimmung	33
3.6 Durchflusszytometrische Zellanalyse (FACS) und Zellsortierung (Sort).....	34
3.6.1 Oberflächenfärbung von Zellen	36
3.6.2 Intrazelluläre Zytokin-Färbung.....	37
3.6.3 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Sort)	37
3.7 Analyse der T-Zellproliferation (<i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i>).....	37
3.7.1 Negativselektion von T-Zellen aus einer Zellsuspension (MACS).....	37
3.7.2 Markierung von Lymphozyten mit CFSE.....	38
3.7.3 Adoptiver Zelltransfer	39
3.7.4 Kokultur T-Zellen mit gesorteten DCs	39
3.8 Antigenaufnahme und Antigenprozessierung.....	39
3.9 Apoptoseassay.....	39
3.10 BrdU- Inkorporationsassay	41
3.11 Depletion von DCs	41
3.12 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	41
3.12.1 Gewinnung von murinem Serum.....	42
3.12.2 Durchführung des ELISAs.....	42
3.13 Interaktion von DCs und Yersinien	42
3.14 Statistik.....	43
4 Ergebnisse.....	44
4.1 Analyse der cDCs nach einer Ye Infektion	44
4.1.1 T-Zell-Proliferation <i>in vivo</i>	44
4.1.2 T-Zell-Proliferation <i>ex vivo</i>	46
4.1.3 Antigenaufnahme und –prozessierung nach Infektion mit Ye	48
4.1.4 Größe, Zellzahl und Bakterienanzahl der Milz nach Infektion mit Ye	51
4.1.5 Infektion mit Ye führt zu DC-Verlust in der Milz.....	54

4.1.6 Nekrose und Apoptose von DCs nach Infektion mit Ye.....	57
4.1.7 Expression der DC-Oberflächenmarker CD4 und CD8 α nach Infektion mit Ye.....	62
4.1.8 Hitze-inaktivierte Ye besitzen keinen Effekt auf DCs <i>in vivo</i>	64
4.1.9 Turnover-Rate der DCs nach Infektion mit Ye <i>in vivo</i>	64
4.1.10 Rekrutierung von DC Subpopulationen in die Milz nach Infektion mit Ye68	
4.1.11 Entwicklung der DCs aus ihren Vorläuferzellen nach Infektion mit Ye	69
4.1.12 Produktion von Flt3-Ligand nach Infektion mit Ye	75
4.2 Die Rolle von YopP auf die Funktion der DCs <i>in vivo</i>	76
4.2.1 Einfluss von YopP auf die T-Zell-Proliferation.....	76
4.2.2 YopP hemmt die Antigenaufnahme von CD8 α^+ DCs	77
4.2.3 YopP induziert die Maturation und Produktion der Zytokine im frühen Verlauf der Infektion.....	80
4.2.4 Gesamtzellzahl, Größe und Bakterienmenge in der Milz nach Infektion mit Ye pYV ⁺ und Ye pYV ⁺ Δ yopP.....	82
4.2.5 DC-Subpopulation nach Infektion mit Ye pYV ⁺ Δ yopP	85
5 Diskussion	95
5.1 Ye beeinflusst die Funktion und Entwicklung der DC-Subpopulation <i>in vivo</i> ...	95
5.2 YopP beeinflusst die Funktion der DC-Subpopulationen.....	105
6 Zusammenfassung	109
7 Referenzen	111
8 Anhang	128
8.1 Publikationen.....	128
8.2 Lebenslauf.....	129
8.3 Dank.....	130

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Dendritische Zellen in der Maus	2
Tab. 2: Entwicklung der cDCs	4
Tab. 3: Chromosomal- und Plasmid-codierte Virulenzfaktoren von Ye	15
Tab. 4: Übersicht der verwendeten Antikörper	25
Tab. 5: Emissionsmaxima der Fluorochrome	35

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Ursprung und Entwicklung der DCs und Monozyten	3
Abb. 2 Übersicht Toll-Like-Rezeptoren	6
Abb. 3 Charakteristische Merkmale von unreifen und reifen DCs	7
Abb. 4 Stimulation der T-Zellen und die Differenzierung in T-Helferzellen	8
Abb. 5: Eintritt und Ausbreitung von Ye im menschlichen Wirt	11
Abb. 6: Sekretion der Yersinia outer Proteins (Yops) durch das Ysc-Injektisoms.....	14
Abb. 7 Immunbiologie von <i>Y. enterocolitica</i>	18
Abb. 8 Schematischer Aufbau des Durchflusszytometers	36
Abb. 9: Experimentelle Strategie zur Analyse der T-Zell-Proliferation <i>in vivo</i>	45
Abb. 10: Gating-Strategie des T-Zell-Proliferationsassay	45
Abb. 11: Auswertung der T-Zellproliferation <i>in vivo</i>	46
Abb. 12: Experimentelle Strategie zur Analyse der T-Zell-Proliferation <i>ex vivo</i>	46
Abb. 13: Analyse der T-Zell-Proliferation <i>ex vivo</i> (OVA-Protein)	47
Abb. 14: Analyse der T-Zell-Proliferation <i>ex vivo</i> (OVA-Peptid).....	48
Abb. 15: Experimentelle Strategie zur Analyse der Antigenaufnahme und - Prozessierung	49
Abb. 16: FACS-Analyse der Antigenaufnahme und -prozessierung von DCs	49
Abb. 17: Antigenaufnahme der DC-Subpopulationen <i>in vivo</i>	50
Abb. 18: Antigenprozessierung der DC-Subpopulationen <i>in vivo</i>	50
Abb. 19: Gewichtszunahme der Milz von C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit Ye... 52	
Abb. 20: Anstieg der Zellzahl in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit Ye	52
Abb. 21: Bakterienzahlen in der Milz in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit Ye.....	52
Abb. 22: Gewichtszunahme in C57BL/6, TLR2 ^{-/-} /4 ^{-/-} , MyD88 ^{-/-} und TRIF ^{-/-} Mäusen nach Infektion mit Ye	53
Abb. 23: Gesamtzellzahl in der Milz von C57BL/6, TLR2 ^{-/-} /4 ^{-/-} , MyD88 ^{-/-} und TRIF ^{-/-} Mäusen nach Infektion mit Ye	53

Abb. 24: Bakterienanzahl in C57BL/6, TLR2 ^{-/-} /4 ^{-/-} , MyD88 ^{-/-} und TRIF ^{-/-} Mäusen nach Infektion mit Ye.....	53
Abb. 25: Analyse der DC-Subpopulationen in C57BL/6-Mäuse im Verlauf der Infektion mit Ye.....	55
Abb. 26: Analyse der DC-Subpopulationen im Verlauf der Infektion mit Ye	56
Abb. 27: Durchflusszytometrische Darstellung des Zelltodes mit 7-AAD in murinen DC-Subpopulationen	58
Abb. 28: Analyse des Zelltodes mit 7-AAD in C57BL/6 Mäuse im Verlauf der Infektion mit Ye	58
Abb. 29: Analyse des Zelltodes in Mäuse drei Tage nach Infektion mit Ye	59
Abb. 30: Durchflusszytometrische Darstellung der Apoptose in DC-Subpopulationen	61
Abb. 31: Analyse apoptotischen DC-Subpopulationen in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit Ye.....	62
Abb. 32: FACS-Analyse der Interaktion von murinen Milzzellen und Ye <i>in vitro</i>	63
Abb. 33: Analyse der DCs in der Milz nach Injektion von hitze-inaktivierten Yersinien	64
Abb. 34: Experimentelle Strategie zur Analyse der Proliferationsrate von DC Subpopulationen.....	65
Abb. 35: Durchflusszytometrische Analyse der BrdU ⁺ DCs nach Infektion mit Ye.....	66
Abb. 36: Analyse der Proliferationsrate von DCs nach Infektion mit Ye	67
Abb. 37: Experimenteller Aufbau zur Analyse der DCs recovery in CD11cDOG Mäusen.....	68
Abb. 38: Analyse der DC Subpopulationen in CD11cDOG Mäuse.....	69
Abb. 39: Bakterienmenge im Femur im Verlauf der Infektion mit Ye	70
Abb. 40: Gesamtzellanzahl im Femur im Verlauf der Infektion mit Ye.....	70
Abb. 41: Durchflusszytometrische Charakterisierung der MDPs/CDPs im Knochenmark	71
Abb. 42: Analyse der MDPs/CDPs im Knochenmark im Verlauf der Infektion mit Ye71	
Abb. 43: Durchflusszytometrische Charakterisierung der pre-cDCs in der Milz.....	72
Abb. 44: Analyse der pre-cDCs in der Milz im Verlauf der Infektion mit Ye	73

Abb. 45: Analyse der pre-cDCs im Blut im Verlauf der Infektion mit Ye	74
Abb. 46: Bestimmung von Flt3L im murinem Serum.	75
Abb. 47: T-Zellproliferation nach Infektion mit Ye pYV ⁺ und Ye pYV ⁺ ΔyopP <i>in vivo</i> . 76	
Abb. 48: FACS-Analyse der Antigenaufnahme u. -prozessierung nach Infektion mit Ye YopP- defiziente Mutante <i>in vivo</i>	78
Abb. 49: Antigenaufnahme der DC-Subpopulationen nach Infektion mit Ye pYV ⁺ ΔyopP <i>in vivo</i>	79
Abb. 50: Antigenprozessierung der DC-Subpopulationen nach Infektion mit Ye pYV ⁺ ΔyopP <i>in vivo</i>	79
Abb. 51: Expression der MHC-Klasse II-Moleküle nach Infektion mit Ye pYV ⁺ ΔyopP	81
Abb. 52: Expression der kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 nach Infektion mit Ye pYV ⁺ ΔyopP	81
Abb. 53: TNF-α-Produktion in Milz-DCs nach Infektion mit Ye pYV ⁺ ΔyopP <i>in vivo</i> ... 82	
Abb. 54: Analyse der Gesamtzellzahl, Gewicht und Bakterienmenge in der Milz von C57BL/6 Mäusen	83
Abb. 55: Analyse der Gesamtzellzahl, Gewicht und Bakterienmenge in der Milz von C57BL/6 und Myd88 ^{-/-} Mäusen	84
Abb. 56: Analyse der DC Subpopulation nach Infektion mit Ye pYV ⁺ und Ye pYV ⁺ ΔYopP	86
Abb. 57: Analyse der DC Subpopulation nach Infektion mit Ye pYV ⁺ und Ye pYV ⁺ ΔYopP in C57BL/6 und Myd88 ^{-/-} Mäuse	88
Abb. 58: Untersuchung des Zelltodverhaltens nach Infektion von C57BL/6 DC-Subpopulationen mit Ye pYV ⁺ ΔYopP.....	90
Abb. 59: Untersuchung des Zelltodverhaltens nach Infektion von C57BL/6 und MyD88 ^{-/-} DC-Subpopulationen mit Ye pYV ⁺ ΔYopP.....	92
Abb. 60: Untersuchung des Apoptoseverhaltens nach Infektion von C57BL/6 DC-Subpopulationen mit Ye pYV ⁺ ΔYopP <i>in vivo</i>	94
Abb. 61: Hemmung der Funktionen der DC Subpopulationen nach Infektion mit Ye <i>in vivo</i>	99
Abb. 62: Einfluß von Ye auf die Entwicklung, Differenzierung, Zelltod und Proliferation der DC-Subpopulationen während der Infektion <i>in vivo</i>	104

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AD	Actinomycin
Ak	Antikörper
Ag	Antigen
APC	Allophycocyanin
APZ	Professionelle antigenpräsentierende Zelle
a.dest	Aqua destillata
BFA	Brefeldin A
BM	Knochenmark
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C57BL/6	Wildtyp-Mausstamm
CD	Differenzierungscluster: Internationale Nomenklatur für Zelloberflächen Moleküle (CD Nummer)
cDCs	konventionelle (klassische) DCs
CDPs	common DC precursors
CFSE	Carboxyfluorescein Diacetat Succimidyl Ester
DC / DCs	Dendritische Zelle/n
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT	Diphtheria toxin
dpi	day past infection = Tage nach Infektion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	“Forward scatter” = Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
ip	intraperitoneal
iv	intravenös
LN	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol pro Liter
MDPs	macrophage and DC precursors
min	Minute
ml	Milliliter
u.a.	unter anderem
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MPs	Myeloide Vorläuferzellen
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäure
NK	Natürliche Killerzelle
OVA	Ovalbumin (Hühnerei-Albumin)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
PFA	Paraformaldehyd
pDCs	plasmazytoiden Dendritische Zellen
PP	Peyersche Plaques
SLO	Sekundäre lymphatische Organe
SSC	“Sideward scatter” = Seitwärtsstreulicht
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Tab	Tabelle
tg	transgen
TGF	Transforming Growth Factor = Transformierender Wachstumsfaktor
TCR	T-Zell Rezeptor
TH1	T-Helfer-Zelle Typ 1
TH2	T-Helfer-Zelle Typ 2
TipDCs	TNF-und iNOS produzierende dendritische Zellen

TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tregs	regulatorische T Zellen
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
Wt	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Ye	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Yops	Yersinia outer proteins
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Dendritische Zellen (DCs)

1.1.1 Funktion der DCs

Der Pathologe Paul Langerhans identifizierte und beschrieb 1868 erstmals einen neuen Zelltyp in der Epidermis. Diese nach ihm benannte Langerhanszellen (LC) wurden zunächst dem Nervensystem zugeordnet. Erst 1973 charakterisierten Steinman und Cohn den Zelltyp detaillierter und erkannten ihre Funktion als antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems [1, 2, 212]. Aufgrund ihrer einzigartigen Fortsätze (griech: dendron = Baum) wurden sie Dendritische Zellen (DCs) genannt. Die Hauptaufgabe der „Wächter des Immunsystems“, die in fast allen Geweben und Organen vorkommen, ist die Antigenpräsentation. Sie besitzen die Fähigkeit zur Erkennung, Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von extrazellulären Bestandteilen und sind für die Aktivierung der spezifischen T-Zellantwort verantwortlich [2].

1.1.2 Vorkommen und Unterteilung von DCs in der Maus

DCs stellen eine heterogene Population dar, die sich in Ursprung, Lokalisation, in der Expression ihrer phänotypischen Oberflächenmoleküle unterscheiden und unterschiedliche spezifische Funktionen besitzen [3, 4]. Dendritische Zellen werden in zwei Hauptkategorien unterteilt: Konventionelle DCs (cDCs) und nicht-konventionelle DCs. Zu den nicht-konventionellen DCs gehören die plasmazytoiden DCs und die TNF-iNOS-produzierenden DCs (Tip-DCs). Die konventionellen DCs werden nochmals unterteilt in „migratory DCs“, die in den peripheren Geweben Antigen aufnehmen und zu den lymphatischen Geweben migrieren, und die „lymphoid-tissue-resident DCs“, die sich stets im lymphatischen Gewebe aufhalten. Die „migratory DCs“ umfassen z.B. die Langerhans-Zellen und interstitiellen DCs. Die „lymphoid-tissue-resident DCs“ werden in der Maus weiter unterteilt in $CD4^+CD8^-$ cDCs ($CD4^+$), $CD4^-CD8^+$ cDCs ($CD8^+$ DCs) und $CD4^-CD8^-$ cDCs (Doppelnegative = DN), die in Milz, Thymus und Lymphknoten vorkommen (Tabelle 1) [3, 5, 6, 7, 9]. Der Anteil der Gesamtzahl der $CD11c^+$ DCs beträgt 3 % in der Milz. Davon sind 25 % $CD8\alpha^+$, 55 % $CD4^+$ und die restlichen DCs sind doppelnegativ [8].

Tab. 1: Dendritische Zellen in der Maus

(modifiziert nach Alvarez et al., 2000 [9])

DC Subtypen	Oberflächenmarker	Migrationsweg
Langerhans Zellen	Langerin ⁺ MHC II ⁺ Dectin-1 ⁺ CD1a ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ CD24a ⁺ CD205 ⁺ CD45 ^{lo} CD8α ^{+/-} CD103 ⁻	Epidermis → Dermis → Afferente Lymphgefäße → LN
Dermale DCs	Langerin ⁺ MHCII ⁺ CD103 ⁺ CD11b ^{lo} CD11c ^{int} CD45 ^{hi} CD8α ⁻	Dermis → Afferente Lymphgefäße → LN
	Langerin ⁻ MHCII ⁺ CD11c ⁺ DEC205 ⁺ CD24a ⁻	Dermis → Afferente Lymphgefäße → LN
CD8 ⁺ DCs	CD8α ⁺ MHCII ⁺ CD11c ⁺ CD4 ⁻ CD205 ⁺ SIRP-α ⁻	Blut → SLO → BM → Thymus
CD8 ⁻ DCs	CD8α ⁻ MHCII ⁺ CD11c ⁺ CD11b ⁺ CD4 ⁻ SIRP-α ⁺	Blut → SLO → BM → Thymus
CD8α ⁻ CD4 ⁺ DC	CD8α ⁻ CD4 ⁺ CD11b ⁺ MHCII ⁺ DCIR2 ⁺	Blut → Milz
pDCS	B220 ⁺ CD11c ^{lo} Ly6C ⁺ MHCII ^{lo} CD4 ^{-/+} CD8α ^{-/+} PDCA-1 ⁺	Blut → SLO → BM → Thymus → Gewebe
DCs in der Lunge (2 Subpopulationen)	1. CD11b ^{hi} CD11c ⁺ CD103 ⁻ 2. CD11b ^{lo} CD11c ⁺ CD103 ⁺	Lunge → Afferente Lymphgefäße → LN
Lamina propria DCs (4 Subpopulationen)	1. CD11c ^{hi} CD11b ⁻ CD205 ⁺ CD103 ⁺ 2. CD11c ^{hi} CD11b ⁺ CD205 ⁺ CD103 ⁺ 3. CD11c ^{int} CD11b ^{int} CD205 ⁻ CD103 ⁻ 4. CD11c ^{int} CD11b ⁺ CD205 ⁻ CD103 ⁻	Lamina propria → Afferente Lymphgefäße → LN
DCs in den Peyerschen Plaques (3 Subpopulationen)	1. CD11c ⁺ CD8α ⁺ CD11b ⁻ 2. CD11c ⁺ CD8α ⁻ CD11b ⁺ 3. CD11c ⁺ CD8α ⁻ CD11b ⁻	Peyersche Plaques

1.1.3 Entwicklung und Rekrutierung von DCs

Dendritische Zellen stammen von den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Diese besitzen das Potential sich selbst zu erneuern, durch Proliferation und Differenzierung in Progenitorzellen und anschließend in verschiedene Blutzellen auszureifen. Aus den hämatopoetischen Zellen entstehen die myeloiden Progenitorzellen (MPs), die sich zu den „macrophage and DC precursors“ (MDPs) weiterentwickeln [10, 11]. MDPs differenzieren sich zu den Monozyten und „common DC precursor“ (CDPs). Aus den proliferierenden CDPs entwickeln sich die pDCs und die „pre-cDCs“, die im steady state in Knochenmark, Blut und Milz vorkommen und aus denen dann cDCs hervorgehen [11, 12, 13].

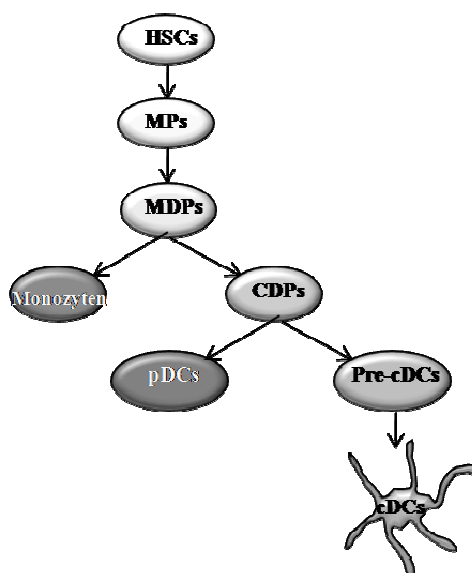


Abb. 1 Ursprung und Entwicklung der DCs und Monozyten

(modifiziert nach Liu et al., 2010 [14])

Alle Entwicklungsstufen können phänotypisch durch die Expression spezifischer Oberflächenantigene charakterisiert werden (Abb.1) [7,11]. An der Entwicklung der cDCs sind verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. STAT3 und STAT5) und Zytokine (z.B. FLT3L, GM-CSF, CSF-1) beteiligt [15, 16]. Die Zellteilungen in den lymphatischen Organen werden durch regulatorische T-Zellen (Tregs), flt3- und Lymphotoxin- β -Rezeptor kontrolliert [11,14,17,18]. Darrasse-Jeze et al. fanden einen „feedback regulatory loop“ zwischen DCs und Tregs, das die Anzahl der beiden Zelltypen im steady state *in vivo* aufrechterhält [19].

Tab. 2: Entwicklung der cDCs

(modifiziert nach Liu et al., 2009; Geismann, 2010 [7,11])

Zelltyp	Vorkommen	Oberflächenmarker
HSC	BM	CD34 ⁺ , SCA-1 ⁺ , Thy1.1 ^{+/lo} , CD38 ⁺ , c-kit ⁺ , Lin ⁻ (Ter119 ⁻ , CD11b ⁻ , CD11c ⁻ , Nkp46 ⁻ , CD3 ⁻ , CD19 ⁻ , Gr1 ⁻ , MHC II ⁻ , Sca1 ⁻ IL-7Ra ⁻)
MPs	BM	CD34 ⁺ SCA-1 ⁻ , c-kit ⁺ , Lin ⁻ (Ter119 ⁻ , CD11b ⁻ , CD11c ⁻ , Nkp46 ⁻ , CD3 ⁻ , CD19 ⁻ , Gr1 ⁻ , MHC II ⁻ , Sca1 ⁻ IL-7Ra ⁻)
MDPs	BM	Lin ⁻ (Ter119 ⁻ , CD11b ⁻ , CD11c ⁻ , Nkp46 ⁻ , CD3 ⁻ , CD19 ⁻ , Gr1 ⁻ , MHC II ⁻ , Sca1 ⁻ IL-7Ra ⁻), CD117 ^{int} , CD34 ⁺ , CD16 ⁺ , CX ₃ CR1 ⁺ , CD115 ⁺ , CD135 ⁺
CDPs	BM	Lin ⁻ (Ter119 ⁻ , CD11b ⁻ , CD11c ⁻ , Nkp46 ⁻ , CD3 ⁻ , CD4 ⁻ , CD8a ⁻ , CD19 ⁻ , Gr1 ⁻ MHC II ⁻ , Sca1 ⁻ , IL-7Ra ⁻) CD117 ^{int/low} , CX ₃ CR1 ⁺ , CD115 ⁺ , CD135 ⁺
Pre-cDCs	BM	CD11b ⁺ , CD11c ⁺ MHC II ⁻ , CX ₃ CR1 ⁺ , CD117 ^{low} , CD115 ⁺ , CD135 ⁺
	Blut, Milz	CD11b ⁺ , CD11c ⁺ MHC II ⁺ , CX ₃ CR1 ⁺ , CD117 ⁻ , CD115 ^{low} , CD135 ⁺ , F4/80 ⁻
pDCs	BM, Blut, SLO	B220 ⁺ , SiglecH ⁺ , BST2 ⁺ , Ly6C ⁺ , CD62L ⁺ , CCR2 ⁺ , CD115 ⁻ , CD11b ⁻ , NKp46 ⁻ , MHC II ^{low} , F4/80 ⁻ , CD11c ^{int} , CD3 ⁻ , CD19 ⁻ , Ly6G ⁻ , CX ₃ CR1 ^{low} , CD43 ⁺
cDCs	SLO	Tabelle 1

1.1.4 Antigenerkennung und Antigenaufnahme durch DCs

DCs können eine vielfältige Anzahl an verschiedenen Antigenen aufnehmen und diese dann, gebunden als Peptide an MHC-I oder MHC-II-Molekülen, T-Zellen präsentieren [20]. Sie regulieren die Qualität der T-Zell-Antwort, d.h. sie entscheiden, welche Effektor-T-Zellen sich ausbilden, die schließlich die entscheidende Rolle bei der Abwehr von Infektionen tragen. Unreife DCs besitzen eine beträchtliche Kapazität Antigene aus ihrer Umgebung mit Hilfe verschiedener Mechanismen aufzunehmen. Die Mechanismen sind Makropinozytose, Phagozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose [21-23]. Über die Makropinozytose werden im unreifen Stadium ständig lösliche Antigene aufgenommen [23-26]. Durch Phagozytose oder

rezeptorvermittelten Endozytose werden durch Apoptose oder Nekrose entstandene Zelltrümmer, Viren und Bakterien, sowie lösliche Antigene internalisiert. Die rezeptorvermittelte Endozytose wird durch Oberflächenproteine der DCs ausgelöst. Die wichtigsten Proteine umfassen die C-Typ Lektin Rezeptoren (Makrophagen-Mannose-Rezeptor = CD206, DEC205) [27], die Fc-Rezeptoren (Typ Fc γ , Fc ϵ) [20] und Toll-like-Rezeptoren (TLR).

1.1.5 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation von DCs

DCs können sowohl exogene als auch endogene Antigene aufnehmen und als Peptide auf zell-eigenen Transportmolekülen (MHC-Klasse I oder II-Molekülen) auf der Zelloberfläche präsentieren. Endogene Antigene werden im Zytosol durch Proteasomen zu kleinen Peptidfragmenten mit einer Länge von 8-9 Aminosäuren prozessiert. Durch selektive Transportsysteme (TAP = Transporter associated with Antigen Processing) werden die Peptide ins Endoplasmatische Retikulum gebracht, um dort auf MHC-Klasse I-Moleküle geladen zu werden. Der Peptid-MHC-I-Komplex wird darauf mit Hilfe des Golgi-Apparates an die Zelloberfläche transportiert und CD8⁺ T-Zellen präsentiert [28-30]. Extrazelluläre Antigene werden in Endosomen aufgenommen und durch Proteasen zu Peptiden mit einer Länge von 12-20 Aminosäuren gespalten. Der Transport der Peptide erfolgt dann gebunden an MHC-II Molekülen an die Zelloberfläche, um sie CD4⁺ T-Zellen zu präsentieren [31,32]. Eine weitere Möglichkeit der DCs extrazelluläre Antigene CD8⁺ T-Zellen über MHC-I-Moleküle zu präsentieren, wird „cross-presentation“ genannt. [31,33].

1.1.6 Maturation von DCs

Die Fähigkeit die Immunantwort zu regulieren hängt vom Maturationsstatus der DCs ab [34]. Die Maturation der DCs kann durch eine Anzahl verschiedener Faktoren wie z.B. die Antigen-Aufnahme und die Antigenprozessierung, durch inflammatorische Zytokine oder durch die Bindung der TLR-Liganden (Abb. 2) induziert werden.

TLRs gehören zur Familie der „*pattern recognition receptors*“ (PRR) und jeder einzelne der 11 bis jetzt bekannten TLRs hat seinen spezifischen Liganden (*pathogen associated molecular patterns* = PAMPs), die hauptsächlich auf bzw. in den pathogenen Erregern zu finden sind. Bindet ein TLR seinen Liganden wird eine

spezifische Immunantwort über die MyD88-abhängige und/oder TRIF-abhängige Signalkaskade ausgelöst [35-39]. Zu den pathogen-assoziierten molekularen Strukturen zählen beispielsweise LPS, Flagellin oder CpG (Abb.2).

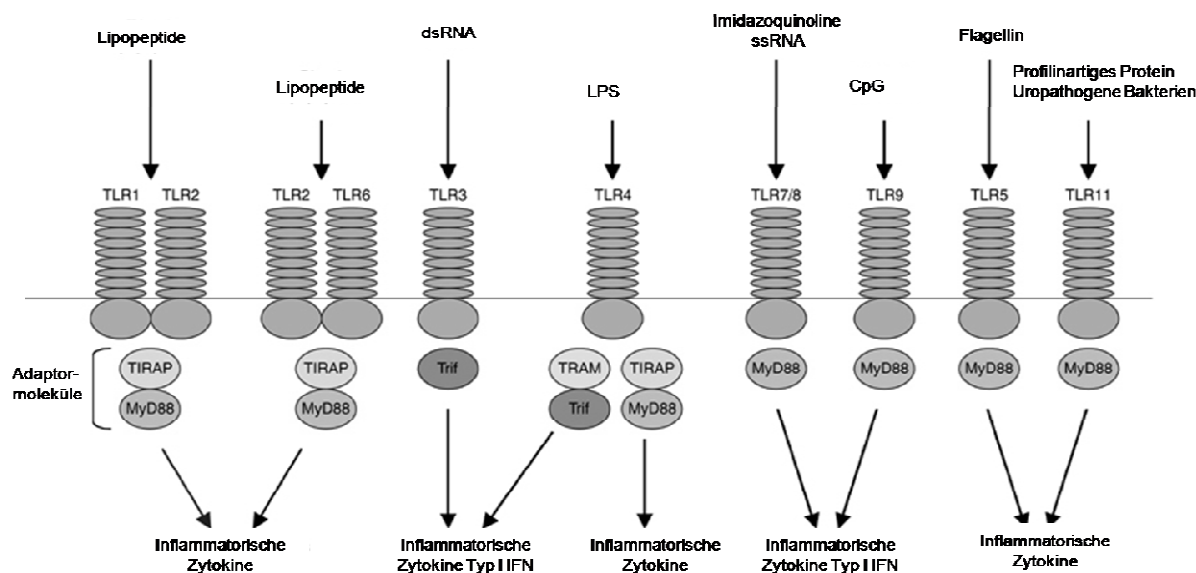


Abb. 2 Übersicht Toll-Like-Rezeptoren

TLR2 heterodimisiert mit TLR1 oder TLR6, wodurch Lipoproteine und Lipopeptide von verschiedenen Pathogenen erkannt werden können. Doppelsträngige RNA von Viren wird von TLR3 erkannt und über den TRIF-Signalweg weitergeleitet. TLR4 erkennt LPS (Bakterien) und kann über verschiedene Adaptormoleküle (MyD88, TRAM, TIRAP und TRIF) die Immunantwort auslösen. TLR7/8 erkennen Imidazoquinoline und ssRNA. TLR9 erkennt unmethylierte DNA (CpG) von Bakterien und Viren. TLR5 dient der Erkennung von bakteriellem Flagellin. Muriner TLR11 erkennt uropathogene Bakterien und *Toxoplasma gondii* (modifiziert nach T. Kawai and S. Akira, 2006 [37]).

Während ihrer Umwandlung von unreifen zu reifen Zellen unterziehen sich die DCs einer Reihe von phänotypischen und funktionellen Veränderungen. Die Maturation der DCs beinhaltet eine Umverteilung der MHC-Moleküle aus dem intrazellulären Kompartiment an die DC Oberfläche, reduzierte Antigen-Aufnahme, einen Anstieg der Expression von kostimulierenden Oberflächenmolekülen (z.B. CD80, CD86 und CD40), morphologischen Veränderung (Bildung der charakteristischen Dendriten), die Sekretion von Chemokinen, Zytokinen und die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren (siehe Abb 3). Durch diese Veränderungen steigern die DCs ihre Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren [2,40,41,42].

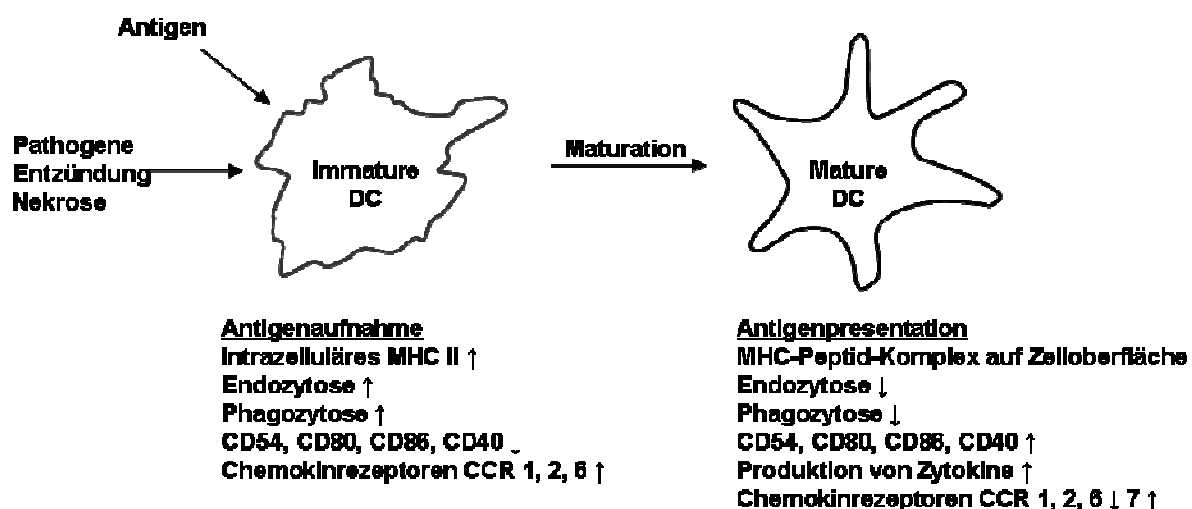


Abb. 3 Charakteristische Merkmale von unreifen und reifen DCs

1.1.7 T-Zell-DC-Interaktion

Nachdem DCs Antigene aufgenommen und prozessiert haben, wandern sie von den Marginalzonen in die T-zellreichen Zonen, um Antigene naiven T-Zellen zu präsentieren und deren Differenzierung in Effektorzellen zu veranlassen. Zur Aktivierung der T-Zellen sind spezifische Signale notwendig. Das Signal entsteht durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den MHC-Peptid-Komplex auf Antigen-Präsentierenden Zellen (APCs) [32,42,43]. Für eine vollkommene Aktivierung benötigen die T-Zellen zusätzliche kostimulatorische Signale, die durch die Interaktion bestimmter Oberflächenmoleküle auf den T-Zellen und APCs ausgelöst werden. Zu den kostimulierenden Molekülen gehören CD40, CD80 und CD86, die auf den DCs exprimiert werden und an die T-Zell-Moleküle CD40L, CD28 und CTLA-4 binden [44,45,46,47]. In Abwesenheit oder bei geringer Expression der kostimulierenden Moleküle werden die T-Effektorzellen nicht aktiviert oder gehen in einen inaktiven, als Anergie bezeichneten, Zustand über [48]. Zytotoxische CD8⁺T-Zellen erkennen Antigen/MHC-Klasse-I-Komplexe auf Zellen, welchen dann von den zytotoxischen T-Zellen lysiert und abgetötet werden. Zusätzlich setzen aktivierte CD8⁺T-Zellen verschiedene Zytokine und Chemokine frei, die Apoptose oder Migration von Leukozyten zum Infektionsherd induzieren [49].

Die Immunantwort der CD4⁺T-Helferzellen wird durch die Interaktion mit DCs ausgelöst. Die CD4⁺T-Helferzellen werden in verschiedene T-Zell-Subpopulationen eingeteilt, die durch unterschiedliche Zytokinsekretionsmuster und die

darauffolgenden Effektorfunktionen charakterisiert werden können [50,51]. Die Th1-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Produktion von IFN- γ , TNF- α und IL-2 aus, wogegen die Th2-Zellen die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 synthetisieren.

Die Abbildung 4 stellt den heutigen Stand der Th-Subpopulationen und ihrer Effektorfunktionen dar [51-53]. Alle DCs in der Milz können *in vitro* und *in vivo* T-Zellen aktivieren, wobei die CD8⁺DCs die Th1 Antwort und die CD8⁻DCs eine Th2 Antwort induzieren [54,55]. Zusätzlich präsentieren CD8⁺ DCs bevorzugt Antigene über „Crosspräsentation“ den CD8⁺ T-Zellen [56].

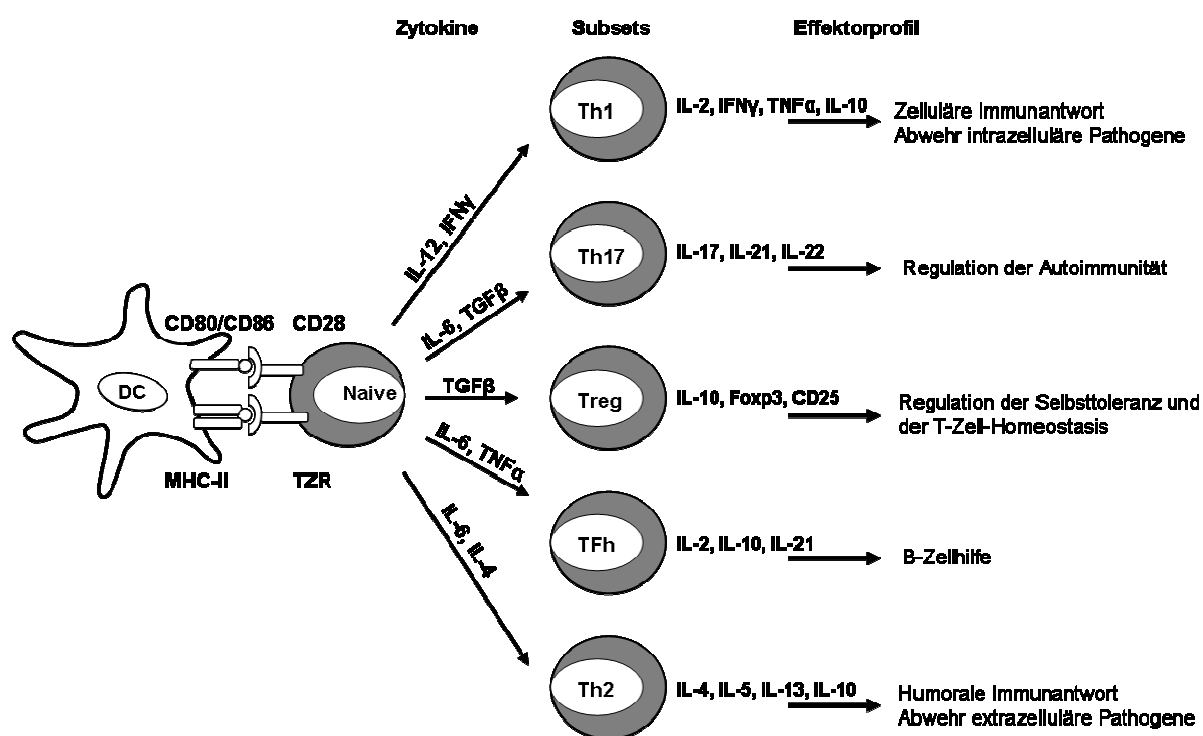


Abb. 4 Stimulation der T-Zellen und die Differenzierung in T-Helferzellen

Differenzierung der T-Helferzellen nach der Interaktion mit DCs. Durch die Expression verschiedener Zytokine werden unterschiedliche Th-Zellen aktiviert: T-Helferzellen1 (Th1) [50,57], T-Helferzellen17 (Th17) [58], regulatorische T-Zellen (Tregs) [59], Follikuläre T-Helferzellen (TFh) [60], T-Helferzellen2 (Th2) [50,57]. Abbildung modifiziert nach Jelley-Gibbs et al., 2008 [52].

1.2 *Yersinia enterocolitica*

1.2.1 Allgemeines

Yersinien sind nach dem Schweizer Bakteriologen Alexandre John Emil Yersin (1863-1943) benannt, der 1894 den Pesterreger (*Yersinia pestis*) in Hongkong entdeckte [61]. Seit 1964 gehören Yersinien zur Familie der *Enterobacteriaceae* und umfassen inzwischen elf Arten [62,63]. Von diesen *Yersinia*-Arten sind drei von besonderer medizinischer Relevanz, da sie humanpathogen sind: Der Erreger der Pest *Yersinia pestis* und die beiden enteropathogenen Arten *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* [62]. Während der Pesterreger in den vergangenen Jahrhunderten die Ursache für Pandemien in Afrika (Justinianische Pest, 5.-7. Jahrhundert), Asien und Europa ("Schwarzer Tod", 13.-15. Jahrhundert, 3. Pandemie 1894) war, sind heute die beiden enteropathogenen Arten nach den Salmonellen- und Campylobacter-Arten einer der häufigsten Erreger von bakteriellen Enteritiden in der westlichen Welt [64,65].

1.2.2 Eigenschaften

Yersinia enterocolitica (Ye) ist ein gramnegatives, fakultativ anaerob sporenloses Stäbchenbakterium, das sich bei Temperaturen zwischen 0°C und 45 °C vermehren kann. Die optimale Wachstumstemperatur liegt jedoch zwischen 25 – 28 °C [66]. Im Gegensatz zu *Yersinia pestis* ist Ye bei unter 30 °C mono- bis peritrich begeißelt und damit beweglich [61,67]. Ye wird aufgrund von biochemischen und serologischen Merkmalen in 6 Biotypen (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) und in 60 Serotypen unterschieden [61,68]. Der Biotyp 1A gilt als apathogen, da diesem das Virulenzplasmid fehlt [69]. In Amerika tritt vorwiegend der Serotyp O:8 (Biotyp 1B) auf, während in Europa v.a. die Serotypen O:9 (Biotyp 2) und Serotyp O:3 (Biotyp 3) beobachtet werden. Ausschlaggebend für die Pathogenität der Biotypen 1B und 2-5 ist das 70 kb große Virulenzplasmids pYV, auf dem ein Typ-III-Sekretionssystem und die Effektorproteine (*Yersinia* outer proteins) kodiert sind [70,71].

1.2.3 Vorkommen und Verbreitung

Yersinia enterocolitica kommt weltweit vor. Die Infektion erfolgt durch Aufnahme von kontaminiertem Fleisch, Milchprodukten und fäkal verunreinigtem Trinkwasser [72, 73]. Eine weitere Übertragungsmöglichkeit ist die Schmierinfektion, die jedoch eher die Minderheit ausmacht [74]. Neben Nagern gehören auch Schweine, Ziegen, Schafe, Rinder und Vögel zu den natürlichen Wirten von Ye [75,76].

1.2.4 Klinische Bild der Yersinien-Infektion

Nach einer Infektion mit Ye tritt die Yersiniose nach etwa 8-10 Tagen Inkubationszeit auf [76,77]. Die Ausprägung und die klinischen Symptome zeigen ein breites Spektrum und sind abhängig von verschiedenen Faktoren wie z.B. Alter und Immunstatus des Betroffenen [76]. In den meisten Fällen jedoch verläuft die Yersiniose selbstlimitierend und heilt ohne medikamentöse Behandlung durch Antibiotikagabe aus. Die Yersiniose äußert sich als akute Enteritis mit abdominalen Schmerzen, Fieber, Erbrechen und Diarrhöe, Enterokolitis oder Pseudoappendizitis. Septische Verläufe sind eher selten, treten dann vor allem bei immunsupprimierten Patienten mit schweren Primärerkrankungen wie z.B. Leberzirrhose, chronischer Hepatitis oder Diabetes mellitus auf [78]. Desweiteren können postinfektiöse Folgeerkrankungen z.B. reaktive Arthritis, Uveitis und Erythema nodosum nach einer Yersinien-Infektion entstehen [74,79].

Zur Diagnostik der Yersiniose sind verschiedene Möglichkeiten vorhanden [66,79,80]:

- Erregernachweis aus dem Stuhl bzw. bei einer systemischen Infektion im Blut
- aus Dünndarmbiopsien oder mesenterialen Lymphknoten
- serologisch durch den Nachweis von Antikörpern gegen O-H-Antigene
- mittels Immunoblots durch spezifische Antikörper gegen *Yersinia* outer proteins

Bei einer akuten Yersiniose, die sich bei immunsupprimierten Patienten zu einer Sepsis entwickeln kann, werden Antibiotika (Cephalosporine der III. Generation, Tetracykline, Chinolone) verabreicht.

1.2.6 Pathogenese der Infektion

Nach der oralen Aufnahme von *Ye* gelangen diese zunächst in den Magen, um von dort aus die Besiedelung des Darms durch Kolonisation des Intestinaltraktes einzuleiten. Nach der Passage der Magenbarriere gelangen die Erreger in das terminale Ileum. Dort wandern sie durch die M-Zellen der intestinalen Mukosa und besiedeln in Folge das darmassoziierte lymphatische Gewebe der Peyer'schen Plaques. M(microfold)-Zellen sind Epithelzellen, die auf die Aufnahme und den Transport von Antigenen aus dem Darmlumen in das lymphatische Gewebe spezialisiert sind (siehe Abb. 5). Dadurch soll bei einer Infektion durch die Peyer'schen Plaques eine Immunantwort ausgelöst werden.

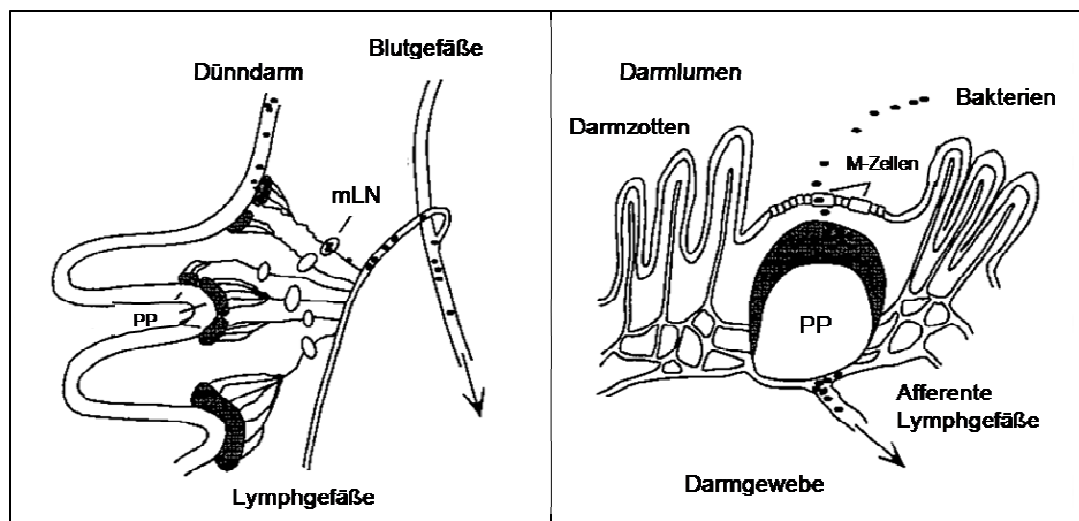


Abb. 5: Eintritt und Ausbreitung von *Ye* im menschlichen Wirt

Peyersche Plaques (PP), mesenterische Lymphknoten (mLN), [Nach Goverde, 81]

Bei einer Yersinien-Infektion kann es auf diesem Weg auch zu einer systemischen Infektion kommen. Unterstützt wird dies von verschiedenen Pathogenitätsfaktoren [82,81,83]. Das plasmidkodierte YadA-Protein sowie die chromosomalen Oberflächenproteine (Invasin und Ail) vermitteln die bakterielle Adhäsion und Invasion in die Wirtszelle durch Bindung an $\beta 1$ -Integrinrezeptoren von benachbarten

Epithelzellen [83-88]. Daraufhin können 24 Stunden später Mikroabszesse in den Peyer'schen Plaques beobachtet werden. Nach der Vermehrung in den PP erfolgt die Dissemination der Yersinien über lymphatische Bahnen und über das Blutgefäßsystem in die mesenterialen Lymphknoten, Milz, Leber und Lunge. [78,89]. Nach der Zelladhärenz werden Yersinia outer Proteins (Yops) über das Typ III Sekretionssystem (Ysc) in die Zelle injiziert.

1.2.5 Virulenzfaktoren

Für die Pathogenität von Ye ist das Virulenzplasmid pYV verantwortlich, welches das Typ III Sekretionssystem und eine Reihe von Virulenzfaktoren (siehe Tabelle 3) kodiert. Das Typ III Sekretionssystem ist ein an eine Nadel erinnernder Injektionsapparat (Ysc-Injektisom), der die Yop Effektorproteine in die Wirtszelle injiziert [70,90,91] (Abb. 6). Ye codiert verschiedene Effektorproteine: die Translokatoren YopB, YopD und LcrV, die eine Pore bilden, damit die Effektorproteine YopH, YopE, YopO, YopM, YopE und YopP in die Wirtszelle transloziert werden können [70,91,92]. Diese Effektorproteine dienen dem Bakterium, das angeborene Immunsystem zu umgehen, um Überleben und Vermehrung sicherzustellen. Sie verhindern die Phagozytose, Ausschüttung von Zytokinen und den „oxidative burst“ durch Neutrophile und Makrophagen, die Lyse durch das Komplementsystem, zerstören das Aktinzytoskelett, induzieren Apoptose und modulieren verschiedene Signalwege [93,94]. YopH ist eine Tyrosinphosphatase, die durch Dephosphorylierung der Wirtszellproteine z.B. Proteine des fokalen Adhäsionskomplexes die Aktinstrukturen zerstört [95]. Dies hat zur Folge, dass die Phagozytose inhibiert wird [67]. Neben der Hemmung der Aktivierung von T- und B-Zellen, induziert YopH Apoptose in T-Zellen [94,96]. Nach der Deletion von YopH ist die Virulenz von Ye bei Mäusen deutlich vermindert [97]. YopE (GTPase aktivierendes = GAP) hemmt die GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42, die in der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind. Durch die Auflösung des Aktinmikrofilaments wird die antiphagozytäre Funktion von Ye gefördert [67]. YopT (Cystein-Protease) spaltet die Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42. Die dadurch verursachte Destabilisierung des Zytoskeletts führt zur Hemmung der Phagozytose [98,99]. YopM besitzt Leuzin-reiche-Wiederholungsmotive (LRR = leucin rich repeats) und eine Sequenz für den Transport in den Zellkern. Nach der Injektion ins

Zytoplasma erfolgt der Transport in den Zellkern mittels Vesikel [100]. Zusätzlich interagiert YopM mit den Kinasen PRK2 und RSK1 im Zytoplasma, die beteiligt an der Regulation der Transkriptionsfaktoren und des Zellzykluses sind. Desweiteren hemmt YopM die Aggregation von Thrombozyten [101]. Bisher wurde noch keine antiphagozytäre Funktion, wie bei den anderen Yops, gefunden. Infektionsversuche mit YopM-defizienten Yersinien *in vivo* zeigten, dass die Virulenz in Mäusen deutlich abnimmt [102]. YopO ist eine Serin / Threonin-Protein-Kinase mit 4 Domänen, die unterschiedliche Aufgaben besitzen. Der N-terminus von YopO vermittelt die Sekretion aus den Bakterien, die Translokation in die Zielzelle und die Lokalisation an der Zellmembran der Zielzelle. YopO bindet ebenfalls an RhoA und Rac1, phosphoryliert Aktin und hemmt den Signaltransduktionsweg für die Phagozytose [Barz 2000]. Die Virulenz war bei Maus-Infektionsstudien mit YopO-defizienten Ye nicht vermindert [97]. Wie die Interaktion oder Injektion von Ye oder der Yops *in vivo* vor allem mit DCs genau verläuft, ist bislang noch nicht genau geklärt. Mittels eines Reportersystems, das aus einem β -Laktamase sensitiven Farbstoff (CCF2-AM bzw. CCF4-AM) und Yop- β -Laktamase Fusionsprotein besteht, konnte die Injektion von Yops *in vivo* im Ye-Mausmodell nachgewiesen werden. Köberle et al. zeigten, dass nach einer Infektion vor allem Granulozyten, B-Zellen, Makrophagen und DCs das Hauptziel der Yops sind [103]. Autenrieth et al. untersuchte die Infektionsrate der DC-Subpopulationen in der Milz mittels des Reportersystems von Köberle et al.. Sie konnten zeigen, dass ca. 15 % der einzelnen DC-Subpopulationen einen Tag nach Infektion *in vivo* infiziert sind [104]. Ähnlichen Ergebnisse konnte Marketon et al. mit Infektionsversuchen mit *Yersinia pestis* zeigen. Zwei Tage nach Infektion wurden in ca. 15 % aller DCs in der Milz Yops gefunden [105].

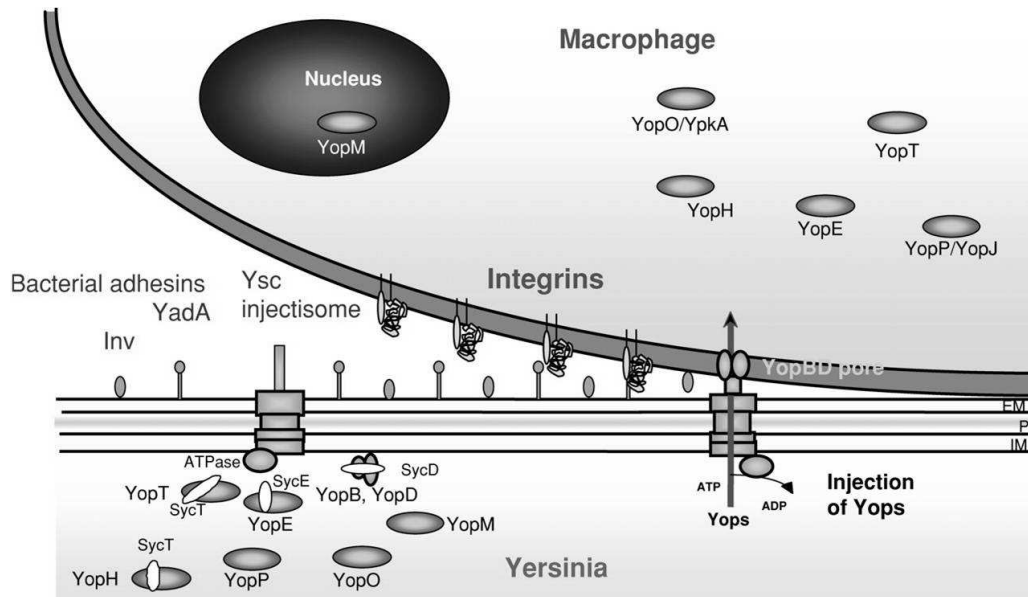


Abb. 6: Sekretion der Yersinia outer Proteins (Yops) durch das Ysc-Injektisoms

und die Translokation durch die Zellmembran des Wirtes. Bei einer Infektion mit Ye exprimieren diese die Ysc-Injektisome und die Yops. Eine Verbindung von Ye und der Zielzelle wird über Adhäsine (Inv, YadA) und Integrine gebildet. Sind die Yersinien an die Zelloberfläche gebunden, wird das Ysc-Injektisom geöffnet, die Translokatoren YopB, YopD und LcrV bilden die Poren, damit die Translokator-Yops in die Zelle transloziert werden können (nach Cornelis, 2002 [91]).

Dem adaptiven Immunsystem kommt eine wichtige Rolle bei der Elimination der Bakterien zu. T-Zellen sind für den Organismus essentiell, um die Infektion zu kontrollieren. In Versuchen mit T-Zell-defizienten Mäusen wurde beobachtet, dass es ihnen unmöglich war, die Infektion zu kontrollieren und die Infektion zu klären [106,107]. Der adoptive Transfer von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in diese T-Zell-defizienten Mäuse ergab, dass Yersinien-Infektion bekämpft wurde. Die T-Zell-Aktivierung erfolgt über dendritische Zellen [108]. Vor allem $IFN-\gamma$, TNF, IL-12 und IL-18 sind wichtige Zytokine für die Klärung der Infektion. Es wird vermutet, dass T-Zellen durch $IFN-\gamma$ Produktion Makrophagen aktivieren, die letztendlich die Erreger eliminieren [109,110].

Tab. 3: Chromosomal- und Plasmid-codierte Virulenzfaktoren von Ye

Chromosomal -codiert	Funktion
Ail	attachment invasion locus vermittelt Adhäsion und Invasion in M-Zellen Serumresistenz [88,111,112]
Inv	Invasin (Adhäsion) bindet an β 1-Integrine und ermöglicht die Transzytose durch M-Zellen in die PP Internalisierung in Epithelzellen [82,113-115]
Myf	mucoid yersinia factor (Fimbrienprotein) Kolonisierungsfaktor; führt zusammen mit Yst zu Diarrhöe [116]
Yst	Hitzestabiles Enterotoxin Stimuliert die Guanylat-Zyklase intestinaler Epithelzellen führt zusammen mit Myf zu Diarrhöe [117]
HPI	high pathogenicity island kodiert das Sideropor Yersiniabactin und assoziierte Gene Vermittelt die Eisenaufnahme Hemmung von Makrophagen, Neutrophilen, T- und B-Zellen [118,119]
Plasmid-codiert	Funktion
YopE	Zytotoxin zerstört Aktin-Filamente GTPase-aktivierendes Protein;interagiert mit Rho, Rac, CDC42 und blockiert so die Phagozytose [120-122]
YopB	Transmembranprotein, Translokationfunktion [92]
YopD	Transmembranprotein, Translokationfunktion [92]
LcrV	V-antigen Translokationsfunktion [123,124]
YopT	Cystein-Protease Zerstörung der Aktin- Filamente, Veränderung des Zytoskeletts [99]
YopH	Protein- Tyrosin Phosphatase Hemmung der Phagozytose durch Auflösung der fokalen Adhäsions-Komplexe Hemmung der T-und B-Zell-Aktivierung [94,95]
YopM	Thrombinbindung, Thrombozytenaggregationshemmer Transport in den Nukleus [125, 100]
YopO	Serin/Threonin-Protein-Kinase Zerstört Aktin-Zytoskelett u. hemmt Phagozytose [102,126]
YopP	Cystein-Protease Inhibition der MAP Kinase &NF-kB-Signaltransduktionswege Induktion von Zelltod Hemmt Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [127-132]
YadA	Vermittelt Phagozytoseresistenz Verantwortlich für die Adhärenz an Epithelzellen Schützt gegen Lyse des Komplementsystems [127,133,134]

1.2.6 *Yersinia outer protein P*

YopP ist eine Cystein-Protease, die die Aktivierung von einigen wichtigen Signaltransduktionswegen des angeborenen Immunsystems beeinträchtigt [92,135]. Es inhibiert den NF- κ B und MAP-Kinase Signaltransduktionsweg. Dies hat zur Folge, dass die Freisetzung von Zytokinen (IL-8, TNF- α , IL-12) durch verschiedene Immunzellen gehemmt und Apoptose in Makrophagen und DCs induziert wird [94,128,129,131,136,137]. Die Beeinträchtigung des angeborenen Immunsystems ermöglicht den Bakterien, sich erfolgreich im Wirt zu vermehren und auszubreiten [97,130]. Die molekularen Mechanismen, durch die YopP seine Wirkungen auf die Wirtszelle entfaltet, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde gezeigt, dass YopP an Moleküle der MAPK-Familie und an der NF- κ B aktivierenden I κ B Kinase β bindet und diese blockiert [138]. Die Blockierung der NF- κ B- Aktivierung erfolgt indirekt über Deubiquitylierung der Proteine TRAF2 und TRAF6 [139]. Zusätzlich hemmt YopP die Degradation des direkten Inhibitors von NF- κ B (Inhibitor kappa B α = I κ B α) durch das Proteasom. Aus diesem Grund wird NF- κ B nicht aus dem Zytosol in den Nukleus transloziert [131]. Zusätzlich zur verringerten NF- κ B Aktivierung kommt es zur Spaltung von Caspasen, die zur Apoptose von DCs und Makrophagen führen [136,140]. In Experimenten mit der YopJ (YopP bei Ye) Mutante und dem Wildtyp-Stamm von *Y. pseudotuberculosis* mit der gleichen bakteriellen Belastung in den lymphatischen Geweben wurde beobachtet, dass die YopJ Mutante schneller aus den infizierten Organen eliminiert wurde als der Wildtypstamm [130]. Die *Y. enterocolitica* *pYV⁺ Δ YopP* Mutante war ähnlich attenuiert in Maus-Infektionsexperimenten [97,132].

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort gegen Bakterien sind DCs als Vermittler zwischen angeborener und erworbener Immunität von wesentlicher Bedeutung. Die Interaktion der DCs mit den Pathogenen ist für den weiteren Verlauf einer Infektion ausschlaggebend. Die unterschiedlichen DC-Populationen besitzen die Fähigkeit, zwischen verschiedenen Mikroorganismen zu differenzieren und eine individuelle antimikrobielle Immunantwort einzuleiten. Durch die Schlüsselrolle der DCs ist es nicht überraschend, dass pathogene Bakterien verschiedene Strategien entwickelt haben, um dieser Erkennung zu entgehen und damit ihre Elimination zu verhindern. *In vivo* Untersuchungen nach Infektionen mit *E.coli* zeigten, dass es zur Maturation und Apoptose von Milz-DCs kommt. Die Maturation wird über TLR2, TLR4 und TRIF vermittelt, hingegen die Apoptose der DCs durch das LPS von *E.coli* über TLR4 [141]. Daten mit *Salmonella enterica serovar typhimurium* (*S. typhimurium*) deuten daraufhin, dass DCs eine entscheidende Rolle im Transport der Bakterien durch die intestinale Barriere zuteil kommt [142]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Anzahl, Lokalisation und die Zytokinproduktion der DC Subpopulationen sich während der Infektion verändert [143-145].

Um die DCs für neue immuntherapeutische Ansätze zu verwenden, muss erst verstanden werden, welche exakte Rolle die DC Subtypen in der Immunantwort bei Infektionsprozessen spielen. *Yersinia enterocolitica* dient als Modellorganismus zur Aufklärung von bakteriellen Interaktionen mit Dendritischen Zellen. Ye hemmt das angeborene Immunsystem, indem es die Phagozytose von Neutrophilen und die Lyse des Komplementsystems hemmen (Abb. 7). Dadurch ist das adaptive Immunsystem essentiell, vor allem die T-Zellen, die durch IFN- γ Produktion Makrophagen aktivieren, die letztendlich die Ye eliminieren. Untersuchungen *in vitro* haben gezeigt, dass DCs nach Infektion mit Ye nicht mehr in der Lage sind, CD4⁺T-Zellen zu aktivieren. Desweiteren konnte Erfurth et al. nachweisen, dass die immunologische Funktionen der DCs, wie die Zytokinproduktion, Maturation, Antigenaufnahme und Antigenprozessierung durch die Infektion mit Ye *in vitro* gehemmt werden [136]. Daher sollte in dieser Arbeit anhand des Yersinia-Maus-Infektionsmodell untersucht werden, ob bzw. wie die immunologische Funktionen der DC-Subpopulationen in der Milz durch Ye *in vivo* beeinträchtigt werden.

Zunächst sollte nach intravenösen Yersinien-Infektionen von Mäusen die immunologischen Funktionen wie Antigenaufnahme, Antigenprozessierung und T-

Zell-Aktivierung der DC-Subpopulationen aus der Milz analysiert werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob Ye den Turnover der DC-Subpopulationen, die Entwicklung und Rekrutierung neuer DC-Subpopulationen aus dem Knochenmark beeinträchtigen können (Projekt 1).

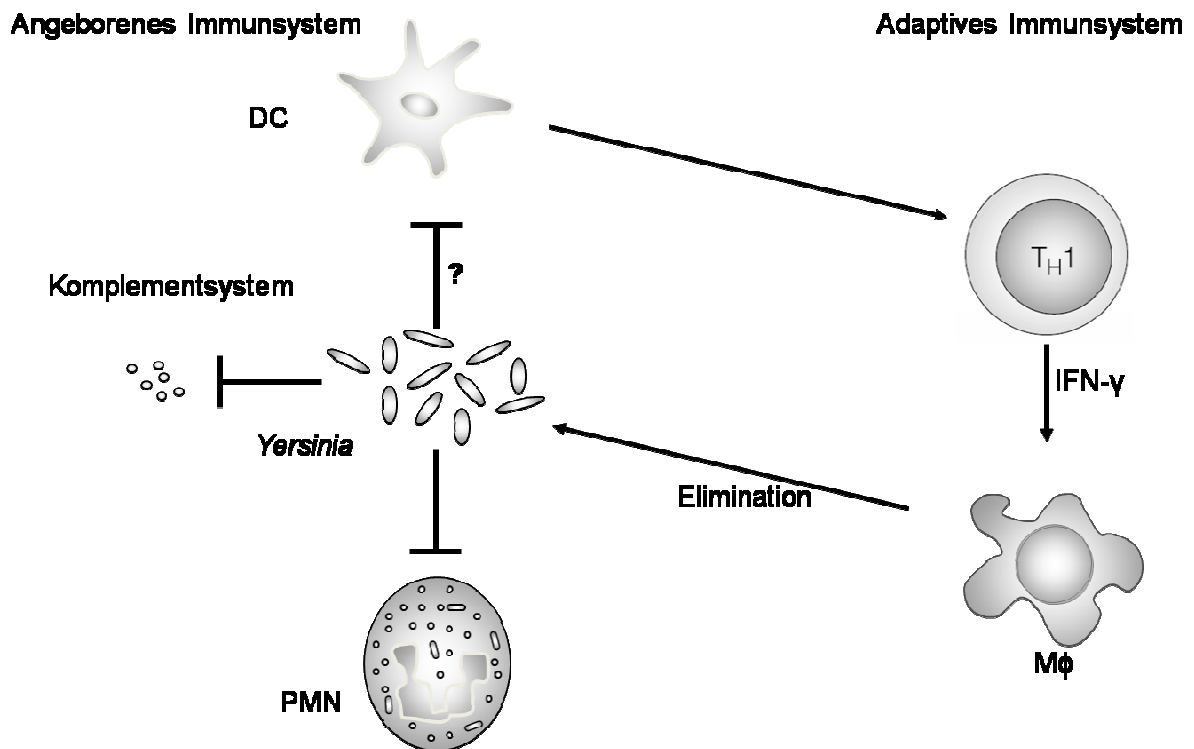


Abb. 7 Immunbiologie von *Y. enterocolitica*

Yersinien können durch verschiedene Mechanismen wie Hemmung der Phagozytose durch Neutrophile (PMN) oder die Lyse des Komplementsystems das angeborene Immunsystem umgehen. Daher sind die T-Zellen des adaptiven Immunsystems essentiell, um die Bakterien zu eliminieren. DCs könnten eine wesentliche Rolle bei der Abwehr der Ye spielen, die in dieser Arbeit analysiert werden sollte.

Das Ziel des 2. Projektes war die Charakterisierung der Effekte von YopP auf DCs *in vivo*. Bisher wurde gezeigt, dass *Yersinia enterocolitica* in der Lage ist, in Makrophagen Phagozytose zu inhibieren und Apoptose in Knochenmark-DCs zu induzieren. Diese Fähigkeiten werden hauptsächlich durch das Effektorprotein YopP ausgelöst. YopP blockt hierbei die Signaltransduktionswege (MAPK, NF-κB) und interagiert mit GTPasen. Desweiteren inhibiert die Infektion der DCs mit *Yersinien*

YopP abhängig die Maturation und die Produktion von TNF- α und IL-12 [136]. Trotz der umfangreichen Studien von YopP Effekten *in vitro* gibt es kaum Anhaltspunkte für die Funktion der YopP auf die DCs *in vivo*. Aus diesem Grunde sollte der Einfluss des Pathogenitätsfaktor YopP nach intravenösen Yersinien-Infektionen von Mäusen auf die Antigenaufnahme, die Antigenprozessierung, die Maturation, die Zytokinproduktion, das Apoptoseverhalten und die T-Zell-Aktivierung der DC-Subpopulationen aus der Milz analysiert werden (Projekt 2).

2 Material

2.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden weibliche Mäuse der folgenden Stämme bzw. Zuchtlinien verwendet:

C57BL/6JolaHsd (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln)

TLR2^{-/-}4^{-/-} doppelt-defiziente Mäuse (C57BL/6-Hintergrund) tragen sowohl im TLR2 als auch im TLR4 eine Mutation [146]. Dieser Mauslinie ist nicht in der Lage, über TLR2 und TLR4 Signale weiterzugeben.

Die *TRIF^{-/-}* defizienten Mäuse (C57BL/6-Hintergrund) wurden in den Laboratorien von Bruce Beutler (La Jolla, San Diego, USA) generiert [146]. Die Mäuse sind nicht in der Lage, über den TRIF-Weg Signale weiterzugeben.

MyD88^{-/-} defiziente Mäuse (C57BL/6-Hintergrund) weisen kein intrazelluläres Adaptermolekül MyD88 mehr auf. Diesen Mäusen ist es nicht möglich, MyD88-Signale weiterzuleiten [36].

Die transgene Mauslinie *OT-II* (C57BL/6-Hintergrund) besitzt einen T-Zell-Rezeptor (TCR), der das Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ über MHC-Klasse II I-A² erkennt [147]. Der TCR kann spezifisch mit dem mAb anti-Maus V α 2 nachgewiesen werden.

CD11cDOG, dieser transgene Mausstamm (C57BL/6-Hintergrund) wurde vom DKFZ AG G. Hämmerling generiert [114]. Der Diphtherie Toxin (DT) Rezeptor wird durch den CD11c Promotor kontrolliert, d.h. durch Injektionen von DT kann erreicht werden, dass die DCs depletiert werden.

Die *C57BL/6* wurden vom Züchter gekauft und hatten 5 bis 7 Tage nach Anlieferung Zeit, sich an die neuen Haltungsbedingungen zu gewöhnen, bevor mit den Experimenten begonnen wurde. Alle anderen Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe gezüchtet.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Tiere durchschnittlich 6-12 Wochen alt. Die verwendeten Mausstämme wurden unter spezifisch-pathogenfreien (SPF) Bedingungen, Wasser und Futter *ad libitum*, bis zu fünf Tiere in einem Käfig, künstlicher Tag-Nacht-Zyklus, in den Tierställen des Universitätsklinikums Tübingen

gehalten. Die Durchführung der in dieser Arbeit vorgestellten Tierversuche wurde unter der Tierversuchsnummer IM5/08 und der Anzeige 09.10.2007 durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

2.2 Bakterienstämme

Wildtypstamm: *Yersinia enterocolitica* pYV⁺ Serotyp 0:8, WA-314; klinisch isoliert; enthält das Virulenzplasmid pYV und ist resistent gegenüber Nalidixinsäure [148,149].

YopP-defiziente Mutante: pYV⁺ΔyopP; abgeleitet von *Yersinia enterocolitica* WA-314, Insertionsinaktivierung von yopP; trägt Nalidixinsäure und Chloramphenicol - Resistenzkassette [131].

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Bovines Serumalbumin FraktionV (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Actinomycin D (AD)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Antibiotika	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Brefeldin A (BFA)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Carboxyfluorescein Diacetat Succimidyl Ester	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dulbecco`s Modiefied Eagle Medium (D-MEM)	Biochrom AG, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Diphtheria toxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DNase I	Roche, Deutschland
DQ ovalbumin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert für 30 min bei 56°C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Glycerin	MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland
GM-CSF	Invivogen, San Diego, USA
Heparin-Natrium 10000 I.E/ml	Braun, Melsungen, Deutschland
HEPES	PAA Laboratories, Deutschland
Hühnereiweißalbumin (OVA) V	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kollagenase TypIV	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	MerckKGaA, Darmstadt Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäure (NEAA)	Biochrom AG, Deutschland
Ovalbumin, Alexa Fluor647 conjugate	Invitrogen, Carlsbad, USA
Paraformaldehyd	MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺	PAA Laboratories, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bacto-Agar	Difco, Detroit, MI, USA.
FACS-Flow, -Rinse, -Clean	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Hefeextrakt	Difco, Detroit, MI, USA.

2.4 Medien und Puffer

Alle Medien und Puffer wurden steril hergestellt und verwendet.

Verdaumedium	RPMI 1640 2 % FCS (v/v) Kollagenase Typ IV 1 mg/ml DNase I 100 µg/ml
Erythrozyten-Lyse-Puffer	NH ₄ Cl (4,14g) KHCO ₃ (0,5g) Na ₂ EDTA (1,85 g) ad 500 ml a. dest. steril filtrieren
FACS-Puffer	PBS w/o Mg ²⁺ und Ca ²⁺ 1 % FCS (v/v) 0,09 % Natriumazid
MACS Puffer	PBS w/o Mg ²⁺ und Ca ²⁺ EDTA 2 mM 0,5 % BSA (w/v)
PERM -Puffer	PBS w/o Mg ²⁺ und Ca ²⁺ 0,5 % BSA (w/v) 0,1 % Saponin (w/v)
Einfrriermedium Bakterien	LB-Medium 20 % Glycerin
Fixierungslösung	PBS w/o Mg ²⁺ und Ca ²⁺ 1 % PFA (w/v) AD (2 µl/ml)

DC Medium	RPMI 1640 Glutamin (2 mM) Pen/Strep (100 U/ml) β -Mercaptoethanol (50 μ g) NEAA (1 %) Natriumpyruvat (1mM) GM-CSF (200 U/ml)
T-Zell-Medium	RPMI 1640 Glutamin (2 mM) Pen/Strep (100 U/ml) β -Mercaptoethanol (50 μ g) NEAA (1 %) Natriumpyruvat (1mM) 5 % FCS HEPES (10 mM)
Medium für Bakterienkultur	LB-Medium entsprechende Antibiotika (1:1000 aus Stammlösung) Chloramphenicol-Stammlösung 50 mg/ml Nalidixinsäure-Stammlösung 10 mg/ml
LB Medium	Hefeextrakt (5 g/l) Trypton (10 g/l) Natriumchlorid (0,5 g/l) ad 1 l a. dest. pH-Wert 7,5
MH-Platten	Hefeextrakt (5 g/l) Trypton (10 g/l) Natriumchlorid (0,5 g/l) Bacto Agar (15 g/l) ad 1 l a. dest. pH-Wert 7,5

2.5 Antikörper

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Antikörper

Epitop Anti-(Maus)	Konjugat	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3ε	FITC Purified	145-2C11 KT3	Hamster IgG1 Ratte IgG2a	eBioscience, San Diego, USA Dako Denmark A/S
CD4	PE FITC PacificBlue eFluor450 APC-Alexa750	RM4-5	Ratte IgG2a	eBioscience, San Diego, USA BD Pharmingen™ BD Pharmingen™ eBioscience, San Diego, USA eBioscience, San Diego, USA
CD8a	vioblue FITC FITC PE-Cy7 Biotin	53-6.7	Ratte IgG2a	Miltenyi Biotech, Deutschland eBioscience, San Diego, USA BD Pharmingen™ eBioscience, San Diego, USA eBioscience, San Diego, USA
CD11b	PE FITC APC-Alexa750	M1/70	Ratte IgG2b	BD Pharmingen™ Miltenyi Biotech, Deutschland eBioscience, San Diego, USA
CD11c	FITC PE Biotin APC	N418	Hamster IgG1	eBioscience, San Diego, USA eBioscience, San Diego, USA BD Pharmingen™ Miltenyi Biotech, Deutschland
CD16/CD32 FCIII/II Rezeptor	Purified	2.4G2	Ratte IgG	eBioscience, San Diego, USA
CD19	FITC	6D5	Ratte IgG2a	Miltenyi Biotech, Deutschland
CD24	PacificBlue	M1/69	Ratte IgG2b,k	eBioscience, San Diego, USA
CD40	FITC PE	HM40-3 3/23	Hamster IgM,k Ratte IgG _{2a} ,k	eBioscience, San Diego, USA BD Pharmingen™
CD43	Biotin	S7	Ratte IgG _{2a} ,k	BD Pharmingen™
CD45R (B220)	FITC PE Biotin	RA3-6B2	Ratte IgG _{2a} ,k	eBioscience, San Diego, USA Miltenyi Biotech, Deutschland eBioscience, San Diego, USA
CD45RA	Biotin	14,8	Ratte IgG _{2a} ,k	BD Pharmingen™
CD49b (DX-5)	PE	DX-5	Ratte IgM	Miltenyi Biotech, Deutschland

CD80 (B7-1)	PE FITC	16-10A1	Ratte IgG _{2a,k}	BD Pharmingen™ BD Pharmingen™
CD86 (B7-2)	PE FITC Biotin	GL-1	Ratte IgG _{2a,k}	BD Pharmingen™ eBioscience, San Diego, USA BD Pharmingen™
CD115	Biotin	AFS98	Ratte IgG _{2a,k}	eBioscience, San Diego, USA
CD135 (Flt-3)	PE	A2F10	Ratte IgG _{2a,k}	eBioscience, San Diego, USA
CD172a (SIRP-a)	APC PE	P84	Ratte IgG _{1,k}	BD Pharmingen™ BD Pharmingen™
CD205 (Dec205)	PE	NLDC145	Ratte IgG _{2a}	Miltenyi Biotech, Deutschland
CD206	Biotin FITC	MR5D3	Ratte IgG _{2a}	AbD Serotec, Oxford, UK AbD Serotec, Oxford, UK
F4/80	PE Biotin	BM8	Ratte IgG _{2a,k}	eBioscience, San Diego, USA eBioscience, San Diego, USA
IL-6	PE	MP5-20F3	Ratte IgG _{1,k}	eBioscience, San Diego, USA
IL-12p40/70	PE	C15.6	Ratte IgG ₁	BD Pharmingen™
Ly-6G/Ly-6C (GR-1)	FITC FITC Biotin	RB6-8C5	Ratte IgG _{2b}	BD Pharmingen™ Miltenyi Biotech, Deutschland eBioscience, San Diego, USA
MHCII	PerCP PE FITC Biotin eFluor450	M5/114.15.2	Ratte IgG _{2b}	eBioscience, San Diego, USA eBioscience, San Diego, USA BD Pharmingen™ BD Pharmingen™ eBioscience, San Diego, USA
CD161c (NK1.1)	FITC	PK136	Maus IgG _{2a,k}	eBioscience, San Diego, USA
PDCA-1	Biotin	JF05-1C2.4.1	Ratte IgG _{2b}	Miltenyi Biotech, Deutschland
TER-119	FITC	Ter-119	Ratte IgG _{2b,k}	Miltenyi Biotech, Deutschland
TNF	PE	MP6-XT22	Ratte IgG ₁	BD Pharmingen™
Vα2 TCR	APC	B20.1	Ratte IgG _{2a}	eBioscience, San Diego, USA
Vβ5.1-TCR	FITC	MR9-4	Maus IgG ₁	BD Pharmingen™

Biotin-markierte Antikörper wurden zur Detektion mittels Durchflusszytometrie zusätzlich mit Streptavidin-PE, Streptavidin-PerCP, Streptavidin-PE-Cy7, Streptavidin-PacificOrange, Streptavidin-eFluor450 oder Streptavidin-APC-Cy7 (BD Pharmingen™) gekoppelt.

Sekundärantikörper	Hersteller
Streptavidin-PacificOrange	Invitrogen, Carlsbad, USA
Streptavidin-PE-Cy7	BD Pharmingen™, Deutschland
Streptavidin-APC-eFluor780	eBioscience, San Diego, CA, USA
Streptavidin-eFluor450	eBioscience, San Diego, CA, USA
Streptavidin-PE	BD Pharmingen™, Deutschland
Streptavidin-PerCP	BD Pharmingen™, Deutschland

2.6 Kitsysteme

Kitsysteme	Hersteller
FAM FLICA™ CASPASE-3 & 7 KIT	AbDSerotec, USA
BrdU Flow Kit (FITC)	BD Biosciences Pharmingen™
BrdU Flow Kit (APC)	BD Biosciences Pharmingen™
Mouse Flt-3 Ligand Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, USA
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Deutschland
CD11c MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotech, Deutschland

2.7 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	5075 ELV	Tuttnauer Systec, Deutschland
Analysenwaagen	AC211S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Brutschränke	Hera cell	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Durchflusszytometer	BD FACS Calibur	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
	BD FACS Canto II	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
ELISA Reader	SpectraMAX 340	Molecular Devices, USA
Mausinjektionskammer		Vetter, Tübingen, Deutschland
MACS-Ständer, -Magnet		Miltenyi Biotech GmbH, Deutschland
Handdispenser	Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Multistepper		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe		Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Scantainer		Scanbur LTD Denmark
Schüttelinkubator		InforsAG HT, Schweiz
Sterilisator	Heraus 6120	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Zellsorter	BD FACSAria	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Sterilwerkbank	Tecnoflow integra	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Vortexer	VortexGenie2	Scientific industrie, NY, USA
Wasserbad	1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zählkammer	Neubauer	Multimed, Kirchheim/Teck, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
	Heraus Multifuge3	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Mauskäfig (IVC)	Sealsafe 1284	Techniplast, Hohenpeßen, Deutschland

2.8 Plastik- und Verbrauchsmaterialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Einmalinjektionskanüle	Braun, Melsungen, Deutschland
Einwegpipetten	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Rundbodenröhrchen 13 ml	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Reaktionsröhrchen (FACS)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Einmalspritzen	B.Braun Melsungen AG; BD Pharmingen
Zellkulturplatten (NUNC)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Gasperlen (5 mm)	Multimed, Kirchheim / Teck, Deutschland
Nylon-Zellsiebe (40 µm, 70 µm, 100 µm)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
MACS Säulen	Miltenyi Biotech GmbH, Deutschland
Einmalküvetten	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Handschuhe (Latex)	Ansell Healthcare LLC, USA
Handschuhe (Nitril)	Kimberly Clark, Roswell, USA
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz, Deutschland
Mikrotiter-Platten	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Pasteurpipetten	WU, Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Plastik-Petrischalen	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Skalpelle	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Combitips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.9 Software

Programme

DIVA Software

summit 4.3

Weasel

FlowJo

Prism-4

Canvas9

Hersteller

BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

DakoCytomation, Hamburg

WEHI Biotechnology Centre, Australien

Tree Star, Inc. Oregon, USA

GraphPad Software, San Diego, CA, USA

ACD Systems International Inc, Kanada

3 Methoden

3.1 Kultivierung von Bakterien

Vor der Herstellung von Infektionsstocks wurden die Bakterienstämme „mauspassagiert“, um virulente Yersinien zu selektionieren. Dazu wurden 1×10^7 Bakterien intravenös in eine C57BL/6 Maus gespritzt. 24 Stunden später wurde die Milz entnommen und durch ein Nylon-Sieb in 5 ml PBS gedrückt. Anschließend wurde die Milzsuspension auf entsprechende Antibiotika MH-Agarplatten (Ye pYV⁺ Nal; Ye pYV⁺yopP⁻ Nal, Cm) ausgestrichen. Von diesen Kolonien wurden dann Infektionsstocks hergestellt.

Zur Kultivierung der Bakterien wurde 10 ml LB Medium unter sterilen Bedingungen mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 27 °C inkubiert. Zur Selektion der Stämme und zur Vermeidung von Kontaminationen wurden entsprechende Antibiotika zugesetzt (Ye pYV⁺ Nal; Ye pYV⁺yopP⁻ Nal, Cm). Die über Nacht angezogenen Bakterienkulturen wurden anschließend in 200 ml LB Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt und bei 37 °C geschüttelt. Nach 4 Stunden wurden die Bakterienkulturen bei 4000 g für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 20 ml Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Bakterienkonzentration wurde bestimmt, indem mehrere Aliquots aufgetaut und in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert wurden. Dafür wurde die Bakteriensuspension zweimal mit PBS gewaschen und bei 5000 g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 500 µl sterilem PBS resuspendiert.

3.2 Verdünnungsreihen von Bakteriensuspensionen

Verdünnungsreihen von Bakteriensuspensionen wurden hergestellt, um die Bakterienmenge in den Aliquots der Gefrierkulturen für i.v. Infektion zu bestimmen, die Bakterienmenge in der Infektionssuspension zu überprüfen oder die Bakterientiter in Milz, Knochenmark und Blut von infizierten Mäusen zu ermitteln. Von den eingefrorenen Bakterien-Aliquots oder der Einzelzellsuspension der Milz bzw. des infizierten Knochenmarks oder Blutes von infizierten Mäusen wurde eine Verdünnungsreihe mit 1:10 Schritten hergestellt, indem 100 µl Bakteriensuspension mit 900 µl sterilem PBS verdünnt wurden. Die Verdünnungen wurden zu je 100 µl auf LB-Platten ausplattiert. Sollte die Dosis in der zur Infektion verwendeten

Bakteriensuspension ermittelt werden, wurden aus dieser zunächst 200 µl mit 800 µl PBS verdünnt, und dann weitere 1:10 Verdünnungen hergestellt und ausplattiert. Nach eintägiger Inkubation bei 27 °C wurden die Bakterienkolonien auf den Platten gezählt und daraus die CFU pro Aliquot, Organ oder Milliliter Infektionssuspension berechnet.

3.3 Infektion von Mäusen

Den Versuchstieren wurden die Bakterien intravenös in die Schwanzvene appliziert. Um diesen Vorgang zu erleichtern, wurden die Tiere ca. 6 Minuten mit einer Rotlichtlampe bestrahlt, um durch die daraus folgende Kreislaufanregung eine Vasodilatation der Schwanzvene zu bewirken. Anschließend wurden die Tiere in eine Injektionskammer gesetzt und 200 µl der zuvor angefertigten Bakterienzellsuspension i.v. injiziert.

3.4 Untersuchung der Milz

Um die Milzgröße der Mäuse zu bestimmen, wurden die Mäuse mittels CO₂-Gases und anschließender zervikaler Dislokation gemäß den geltenden Tierschutzregeln getötet. Danach wurde die Milz aseptisch entnommen und das Gewicht mittels Feinwaage bestimmt.

3.5 Isolierung von Leukozyten aus Milz, Knochenmark und Blut

3.5.1 Isolierung von Splenozyten

Nach Tötung der Maus wurde die Milz aseptisch entnommen. Anschließend wurde die Milz mit einer Schere homogenisiert und für 30 min bei 37 °C in 2 ml Verdaumedium inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit Zugabe von 100 µl EDTA-Lösung (100 µM). Die Suspension wurde zur Gewinnung von Einzelzellen über ein Zellsieb mit der Porengröße von 70 µm gegeben. Die Zellen wurden in 5 ml PBS aufgenommen und anschließend bei 400 g, 4 °C und 5 min zentrifugiert.

Um die Erythrozyten zu entfernen, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 5 ml Ery-Lyse-Puffer für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abgestoppt wurde

die Reaktion mit 10 ml PBS + 2 % FCS und anschließend zentrifugiert (400 g, 5 min, 4 °C).

3.5.2 Isolierung von Knochenmarkszellen

Nach dem Töten der Mäuse wurden Femur und Tibia chirurgisch entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in PBS auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Knochen mit in Desinfektionsmittel getränkten Zellstofftüchern von Muskelresten befreit und durch Abschneiden der Femurenden geöffnet. Der Knochenmarkskanal wurde mit PBS unter Verwendung einer Injektionskanüle durch ein Zellsieb (Porenweite 100 µm) gespült, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Zentrifugation erfolgt bei 400 g für 5 min. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen zur Lyse der Erythrozyten in Ery-Lyse-Puffer 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit PBS + 2 % FCS und anschließend bei 400 g für 5 min zentrifugiert.

3.5.3 Isolierung von Blutzellen

Direkt nach dem Töten der Mäuse wurde der Brustkorb geöffnet und das Blut durch das Einführen einer Kanüle in das Herz entnommen. Die Gerinnung des Blutes wurde verhindert, indem dieses in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml PBS und 5 µl Heparin-Natrium (10000 I.E/ml) überführt wurde. Dann wurde das Blut bei 400 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Um die Erythrozyten zu entfernen, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 5 ml Ery-Lyse-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 10 ml PBS + 2 % FCS und anschließend zentrifugiert (400 g, 5 min, 4°C). Diese Schritte wurden zweimal wiederholt.

3.5.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem Trypanblau-Ausschlusstest in der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde die Zellsuspension mit der Trypanblau-Lösung verdünnt und unter dem Mikroskop gezählt. Trypanblau färbt tote Zellen mit defekter

Zellmembran an und ermöglicht damit die Unterscheidung von toten und vitalen Zellen. Die Zellkonzentration wurde folgendermaßen berechnet:

Mittlere Zellzahl (der ausgezählten Quadranten) * Verdünnungsfaktor * 10^4 = Anzahl der Zellen pro ml

3.6 Durchflusszytometrische Zellanalyse (FACS) und Zellsortierung (Sort)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension basierend auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Im Durchflusszytometer werden die mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten-Antikörper markierten Zellen einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Das daraus resultierende Fluoreszenz- und Streulicht wird von verschiedenen Photodetektoren aufgefangen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) ist ein Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC) für die Granularität. Die fluoreszierenden Moleküle absorbieren Licht in einem bestimmten Wellenbereich. Dadurch werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Lichtimpuls fallen die Elektronen wieder auf das ursprüngliche Niveau zurück. Unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe haben verschiedene Absorptions -und Emissionsspektren (Tabelle 5).

Tab. 5: Emissionsmaxima der Fluorochrome
(modifiziert nach BD bioscience [150])

Eingesetzte Fluorochrome	Excitation Laser (nm)	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
FITC, DQ, CFSE	488	494	519
PE	488, 532	496, 564	578
PerCP, 7-AAD	488, 532	482	678
PE-Cy7	488, 532	496, 564	785
APC, Alexa647	633, 633, 635, 647	650	660
APC-Cy7	595, 633, 635, 647	650	785
AmCyan, PaOr	405, 407	457	491
PaBI	405, 407	401	452

Neben der durchflusszytometrischen Analyse von Zellen ermöglicht der FACSAria cell sorter (BD bioscience) auch eine Zelltrennung d.h. aus einem Zellgemisch können bis zu vier unterschiedliche Zellpopulationen parallel isoliert werden. Das Prinzip beruht darauf, dass beim Sortieren ein Flüssigkeitsstrahl erzeugt wird, der nach Passieren des Laserstrahls in Einzeltropfen zerfällt, in denen sich die Zellen im optimalen Fall mit je einer Zelle/Tropfen verteilen. Beim Abreißen der Tropfen erhalten diese entsprechend der vorher festgelegten Sortierkriterien verschiedene Ladungen. Anschließend werden sie bei Passieren des elektrischen Feldes eines Plattenkondensators entsprechend ihrer Ladung unterschiedlich in verschiedene Richtungen abgelenkt und können so getrennt gesammelt werden (Abb. 8).

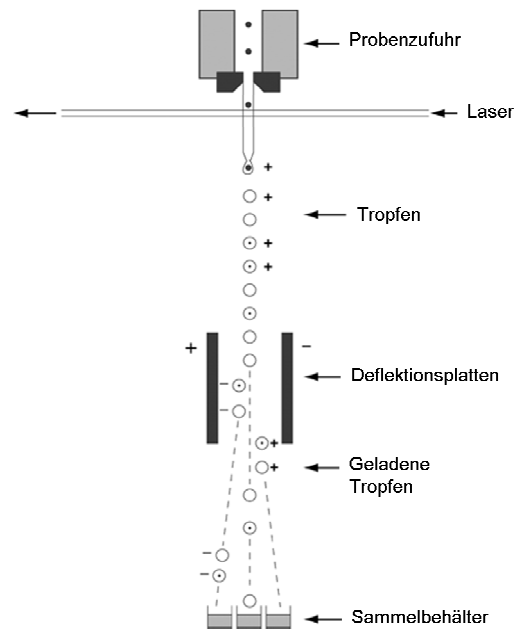


Abb. 8 Schematischer Aufbau des Durchflusszytometers
(modifiziert nach Dean und Hoffman [151])

3.6.1 Oberflächenfärbung von Zellen

Für die Oberflächenfärbung wurden jeweils ca. 3×10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Um unspezifische Bindungen zu vermindern wurden die Zellen mit FC-Block (CD16/32) für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit vorverdünnten Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern 15 min auf Eis inkubiert, mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (400 g, 5 min, 4 °C). Bei Verwendung eines Sekundärantikörpers wurde die Sekundärfärbung nach gleichem Protokoll durchgeführt. Die toten Zellen wurden mit dem Totfarbstoff 7-AAD gefärbt. Dieser Farbstoff wurde mit den Zellen für 10 min bei 4 °C und im Dunkeln inkubiert. Falls die Zellen nach dem Abzentrifugieren (400 g, 5 min, 4 °C) für die intrazelluläre Färbung fixiert werden sollten, wurden diese mit 1 ml 1%igem PFA und 2 µl AD (Fixierungslösung) für 30 min bei 4 °C und im Dunkeln behandelt. Bis zur Messung wurden die Zellen bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Die ideale Konzentration der Antikörper und Sekundärantikörper wurde vorher durch Titration ermittelt. Die verwendeten Antikörper bzw. Fluorochrome sind in Abschnitt 2.5 dargestellt.

3.6.2 Intrazelluläre Zytokin-Färbung

Um die von der Zelle produzierten Zytokine analysieren zu können, wurden die Zellen nach der Erylyse mit Brefeldin A (10 µg/ml) für 4 h bei 37 °C behandelt. Brefeldin A blockiert den Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat. Das hat zur Folge, dass neu synthetisierte Proteine nicht mehr ausgeschieden [152] werden können und sich in der Zelle anhäufen. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, zentrifugiert (400 g, 4 °C, 5 min), gefärbt (3.5.5) und in 1 ml Fixierungslösung für 30 Minuten fixiert. Nachdem die Zellen einmal in FACS-Puffer und einmal in Perm-Puffer gewaschen wurden, färbte man diese mit dem spezifischen Antikörper für das Zytokin. Nach 15 min Inkubationszeit wurden die Zellen in Perm-Puffer gewaschen. Wurde ein Sekundärantikörper verwendet, wurde die Sekundärfärbung nach gleichem Protokoll wie der Primärantikörper durchgeführt. Bis zur Messung wurden die Zellen bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.6.3 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Sort)

Um die gewünschten Zellpopulationen zu erhalten, wurden die Zellen mit Hilfe des FACSAria Cell sorter (BD Biosciences) sortiert. Vor dem Sort wurden DCs mit der MACS Technologie (N418 magnetic beads/Miltenyi) aus gepoolten Milz-Einzelzellsuspensionen aufgereinigt (Prinzip siehe 3.7). Die Methode wurde nach Herstellerangaben (Miltenyi) durchgeführt.

Nach der magnetischen Aufreinigung wurden die Zellen mit FC-Block (CD16/CD32) für 15 min bei 4 °C inkubiert und sedimentiert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD11c, CD4 und CD8 in PBS gefärbt und anschließend an einem FACSAria cell sorter getrennt und für die Kokultur weiterverwendet.

3.7 Analyse der T-Zellproliferation (*in vivo* und *ex vivo*)

3.7.1 Negativselektion von T-Zellen aus einer Zellsuspension (MACS)

Das Prinzip des MACS (Magnetic Cell Separation von Miltenyi) ist, Zellsuspensionen magnetisch zu trennen. Dabei werden die Zellen mit paramagnetischen MicroBeads inkubiert, die an Antikörper gebunden sind. Diese Antikörper erkennen spezifische Zelloberflächenstrukturen und binden an diese. Anschließend wird die

Zellsuspension über eine Separierungssäule gegeben, die von einem Magnetfeld umgeben ist. Bei der hier verwendeten Negativselektion bleiben die Zellen in der Säule, die mit diesen MicroBeads markiert sind und verworfen werden. Die unmarkierten Zellen fließen durch die Säule und werden in einem Reaktionsgefäß aufgefangen.

In dieser Arbeit wurden naive CD4⁺ T-Zellen aus 5-8 Wochen alten OT-II Mäusen isoliert. Dazu wurde die Milz entnommen, durch ein Zellsieb (Porenweite 40 µm) gedrückt, und mit 10 ml PBS gespült wurde. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen zur Lyse der Erythrozyten in Ery-Lyse-Puffer 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit PBS + 2 % FCS, die Zellzahl bestimmt und zentrifugiert (400 g, 5 min, 4 °C). Nach dem Abzentrifugieren wird das Pellet in 40 µl MACS-Puffer und 10 µl des Biotin-Ab-Cocktails pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei 4°C wurde 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-Biotin Microbeads pro 10⁷ Zellen zugefügt und nochmals 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (300 g, 4 °C, 10 min). Danach wurde das Pellet in MACS-Puffer resuspendiert (500 µl auf 10⁸ Zellen). Anschließend wurden die CD4⁺T-Zellen mit Hilfe negativer Selektion (MACS) isoliert. Um die Reinheit der CD4⁺ Aufreinigung zu überprüfen, wurden 2x10⁵ Zellen aus der aufgereinigten Zellsuspension, mit CD4 und Va2 Ak gefärbt und mittels Durchflusszytometer analysiert.

3.7.2 Markierung von Lymphozyten mit CFSE

CFSE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an die DNA anlagert. Ein Vorteil dieses Farbstoff ist, dass er keinen toxischen Effekt auf die Zellen ausübt [153]. Die CFSE-Färbung ermöglicht die Analyse von proliferierenden Zellen, da die Farbstoffmenge pro Zellteilung nur zur Hälfte an die Tochterzellen weitergegeben wird und im Durchflusszytometer detektiert werden kann.

Die zuvor aufgereinigten CD4⁺T-Zellen (bis zu 1 x 10⁸) wurden in 1 ml PBS resuspendiert und auf 10 µl CFSE-Lösung (500 µM; in DMSO gelöst) in einem 50 ml Reaktionsgefäß pipettiert und vermischt. Nach 5 min Inkubationszeit bei RT im Dunkeln wurde die Färbung mit 10 ml FCS abgestoppt und sedimentiert (5 min, 300 g, RT). Anschließend mit 20 ml PBS + 5 % FCS gewaschen und nochmals zentrifugiert.

3.7.3 Adoptiver Zelltransfer

Für den adoptiven Zelltransfer *in vivo* wurden $2,5 \times 10^6$ markierte CD4⁺T-Zellen/Maus benötigt. Die Zellen wurden mit PBS auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und jeweils 100 µl i.v. in die Maus injiziert. Zur Aktivierung der T-Zellen wurde 24 h Ovalbumin Protein (500 µg/Maus) i.v. injiziert. Nach drei Tagen wurde die Milz entnommen und Einzelzellsuspension erstellt und mit CD4 und Vα2 Ak gefärbt und die Zellen mit dem Durchflusszytometer analysiert.

3.7.4 Kokultur T-Zellen mit gesorteten DCs

Für die *ex vivo* T-Zell-Proliferationsanalyse wurden 1×10^4 CFSE-markierte CD4⁺T-Zellen mit 1×10^3 gesorteten DCs in 96-V-well Kulturplatten in DC Medium kokultiviert. Zur Aktivierung wurden 100 µg/ml Ovalbumin-Protein oder 150 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptid zugefügt. Nach drei Tagen bei 37 °C wurden die Zellen mit CD4 und Vα2 Ak gefärbt und mittels Durchflusszytometer analysiert.

3.8 Antigenaufnahme und Antigenprozessierung

Zur Analyse der Antigenaufnahme und der Antigenprozessierung *in vivo* wurde je 100 µg Ovalbumin-AlexaFluor647 und Ovalbumin-DQTM in die Schwanzvene appliziert. Ovalbumin-DQTM ist ein selbstquenches Konjugat aus Ovalbumin und dem grün fluoreszierenden Fluorochrom BODIPYFL. Die Degradation des Proteins vereinzelt („entquencht“) die Fluorochrome, so dass die Fluoreszenzemission im Durchflusszytometer gemessen werden kann. Eine Stunde nach der Injektion wurde die Milz entnommen, weiter verarbeitet wie in 3.5.1 beschrieben und die Ag-Aufnahme und Ag-Prozessierung mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert.

3.9 Apoptoseassay

Programmierter Zelltod oder Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der während der Embryonalentwicklung und bei der Gewebe-Homöostase eine wichtige Rolle spielt. Im reifen Organismus dient sie der Erhaltung des Zellgleichgewichts und der Eliminierung defekter Zellen [154]. Die Zelle nimmt dabei aktiv an ihrem

Abbauprozess teil. Im Gegensatz zur Nekrose wird die Zellmembran nicht zerstört, das Zellplasma nicht freigesetzt und somit auch keine Entzündungsreaktion ausgelöst. Die Apoptose kann durch phänotypische Erkennungszeichen definiert werden. Die Zelle schrumpft, es kommt zu Kondensation und Degradierung der DNA, Mitochondrien werden abgebaut und letztendlich wird die Zelle in sogenannte apoptotische Körperchen fragmentiert, die sehr schnell durch Phagozyten eliminiert werden. Die biochemischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle beruhen auf Aktivierung einer Kaskade von zytosolischen Proteasen - den Caspasen. Diese sind proteinspaltende Enzyme, die nach der Aminosäure Asparaginsäure das Substrat spalten und somit die Funktion des Substrates inaktivieren [155]. Die Apoptose lässt sich in die Initiationsphase und in die Effektorphase unterteilen [156]. Initiator-Caspasen (Caspase-8, -9, -10) sind zu Beginn der Apoptose wichtig und werden durch extrazelluläre Signale oder Zellstreß aktiviert. Ihre Aufgabe ist es, die Apoptose zu regulieren und die nachgeschalteten Caspasen zu aktivieren. Die Substrate der nachgeschalteten Effektor-Caspasen (Caspase-3, -7) befinden sich in allen Bereichen der zellulären Funktionen z.B. bei der DNA-Reparatur, Erhaltung der Zellstrukturen und Regulation des Zellzyklus, die dadurch beeinträchtigt werden [156].

Mit dem hier verwendeten 3/7 -Caspase FLICA™ Kit (Serotec) kann man Apoptose durch die Markierung von aktivierten Caspasen in Zellen messen. Die Technik basiert auf einem zellpermeablen, nicht-toxischen Reagenz (Fluorochrome Inhibitor of Caspases). Das Reagenz enthält eine Caspase Inhibitor Sequenz, die mit einem grünen (Carboxyfluorescein, FAM) Fluorochrom markiert ist und an die Caspasen-3 und 7 bindet. Die Methode wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Insgesamt 3×10^6 Zellen aus Einzelzellsuspension (3.5.1) wurden in 400 µl DC-Medium (ohne GM-CSF) und 10 µl FLICA30x resuspendiert und 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert (400 g, 4 °C, 5 min) und in FC-Block (CD16/CD32) resuspendiert. Nach 15 minütiger Inkubationszeit wurde die Zellsuspension zentrifugiert und mit CD11c, CD8, und CD4 Ak gefärbt (siehe 3.6.1). Um die nekrotischen Zellen zu bestimmen, erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mittels 7-Amino-Actinomycin (7-AAD), wofür die Zellen 30 Minuten mit 20 µg/ml 7-AAD bei RT inkubiert werden. Die Analyse erfolgte durch das Durchflusszytometer.

3.10 BrdU- Inkorporationsassay

Eine Möglichkeit der Zellmarkierung *in vivo* ist der Einsatz von Bromodesoxyuridin (BrdU). Dieses wird anstelle der Base Thymidin in die DNA von mitotisch aktiven Zellen eingebaut und markiert damit neu synthetisierte Tochterzellen. Das eingebaute BrdU kann dann durch einen spezifischen Antikörper im Durchflusszytometer gemessen werden [157].

Für die Analyse wurden den Mäusen täglich 1mg BrdU i.v. in die Schwanzvene appliziert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Mäuse getötet, die Milz entnommen und Einzelzellsuspensionen erstellt. Insgesamt 4×10^6 Zellen wurden nach Anleitung des Kits von BD PharmingenTM gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

3.11 Depletion von DCs

Zur Depletion von Dendritischen Zellen *in vivo* wurde zum angegebenen Zeitpunkt Diphtherie-Toxin (8 µg/mg pro Körpergewicht in CD11c.DOG Mäuse [158]) intraperitoneal injiziert. Die Effektivität der Depletion wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

3.12 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Um die Flt3Ligand-Konzentration im murinem Serum zu ermitteln, wurde der „Mouse Flt-3 Ligand ELISA“ von R&D Systems verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Der ELISA ist eine spezifische und sensitive Methode zur quantitativen Detektion von Antigenen. Bei der vorliegenden Methode wurde Antikörper gegen Flt3L an eine feste Phase gebunden und dann mit murinen Serumproben inkubiert. Befindet sich das gesuchte Antigen in der Probe, wird dieses an den Antikörper gebunden. Nach einem Waschschrift wird ein enzymgekoppelter Detektionsantikörper zugefügt, der an das gebundene Antigen bindet. Um eine Farbreaktion zu erreichen, wird nach einem Waschschrift das Substrat des Enzyms hinzugegeben. Die Farbreaktion, die mit einem ELISA Reader gemessen wird, lässt im Vergleich zu einem definierten Standard einen Rückschluss auf die Menge des vorhandenen Antigens zu.

3.12.1 Gewinnung von murinem Serum

Direkt nach dem Töten der Mäuse wurde der Brustkorb geöffnet und das Blut durch das Einführen einer Kanüle in das Herz entnommen. Das geronnene Blut wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 13000 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

3.12.2 Durchführung des ELISAs

Es wurden für den ELISA jeweils 10 µl Mausserum verwendet. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen. Die Vorbereitung und Messung des ELISAs erfolgte dem Herstellerprotokoll entsprechend (mouse Flt3-Ligand Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, USA).

3.13 Interaktion von DCs und Yersinien

Ye wurden über Nacht bei 27 °C mit entsprechenden Antibiotika in LB-Medium angezogen. Nach 24 h wurde die Übernachtskultur 1:20 in LB-Medium verdünnt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Bakterienkultur zentrifugiert (5 min; 13000 g) und in 1 ml PBS aufgenommen. Die Konzentration der Bakterien-Suspension wurde mit einem Photometer bei 600 nm gegen einen Leerwert (PBS) ermittelt. Die Bakterienzahl pro ml Suspension berechnet sich dann folgendermaßen: $\text{Bakterienzahl / ml} = \text{OD}(600) * 100 * 10^8$. Die Bakterien wurden mit PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Die Milzzellen wurden wie unter 3.5.1 beschrieben hergestellt. Je $2,5 \times 10^6$ Zellen/well wurden in eine unbeschichtete 12 well-Platte in 2 ml DC-Medium ausgesät. Anschließend wurden die Ye in der entsprechenden MOI zu den Milzzellen gegeben und 5 min bei 400 g zentrifugiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37 °C wurde 100 µg/ml Gentamycin dazugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 3 h bzw. 23 h bei 37 °C im Zellkulturbrutschrank. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

3.14 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Graph Pad Prism 4.0 Software. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aufgeführt. Unterschiede werden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**), or $p < 0.005$ (***) ist.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der cDCs nach einer Ye Infektion

4.1.1 T-Zell-Proliferation *in vivo*

Die adaptive Immunantwort durch die T-Zellen ist essentiell, um die Infektion mit Ye zu kontrollieren. Aktivierte T-Zellen sekretieren IFN- γ , das Makrophagen anregt die Erreger zu eliminieren [106,108,109]. Um zu ermitteln, ob Yersinien die T-Zell-Aktivierung durch Dendritische Zellen beeinträchtigen, wurde die T-Zell-Proliferation *in vivo* im Mausinfektionsmodell analysiert. Dafür wurden C57BL/6 Mäuse mit 5×10^4 Ye i.v. infiziert. Kontrollmäusen wurde PBS injiziert. Nach vier Stunden wurden 2×10^6 CFSE-markierte CD4⁺T-Zellen aus OVA-transgenen OT-II Mäuse adoptiv transferiert. Ein Tag nach Infektion erfolgte die Antigenzugabe von Ovalbumin (OVA₃₂₃₋₃₃₉) durch i.v. Injektion. Die Analyse der T-Zell-Proliferation wurde 3 Tage nach Antigengabe mittels Durchflusszytometrie bestimmt (experimentelles Schema siehe Abb. 9). Die Gating-Strategie ist in Abb. 10 dargestellt. Es zeigte sich keine T-Zellproliferation bei Mäusen, die CFSE-markierte T-Zellen aber keine Antigen-Injektion erhalten haben (Abb. 11 rechts). Die CFSE-Markierung der transferierten Zellen ermöglicht ein (Wieder-) Auffinden der Zellen und einen Rückschluss auf das Proliferationsverhalten der T-Zellen. CFSE ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich nach der Zellteilung auf die Tochterzellen aufteilt und demzufolge können neue Generationen von Tochterzellen bzw. Zellteilungen mittels Durchflusszytometer ermittelt werden. Das Ergebnis wird anschließend als „responder frequency“ angegeben [159,160]. Die „responder frequency“ gibt die Anzahl der sich geteilten T-Zellen durch die Gesamtanzahl der T-Zellen an. Durch Zählen der CFSE-Peaks kann sowohl die Anzahl der Teilungen bestimmt werden als auch die Anzahl der sich teilenden Zellen pro CFSE-Peak. Die Analyse der CFSE-Verteilung zeigte eine signifikante Abnahme der „responder frequency“ um etwa 25 % bei Yersinien-infizierten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Abb. 11). Das bedeutet, dass Ye die T-Zell-Proliferation beeinträchtigt.

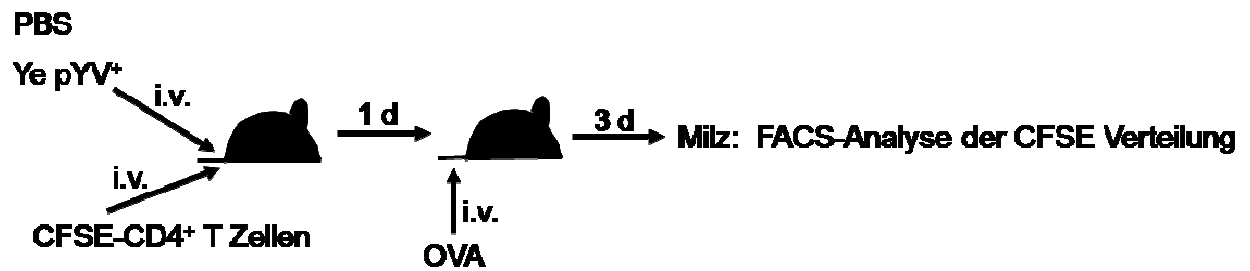


Abb. 9: Experimentelle Strategie zur Analyse der T-Zell-Proliferation *in vivo*

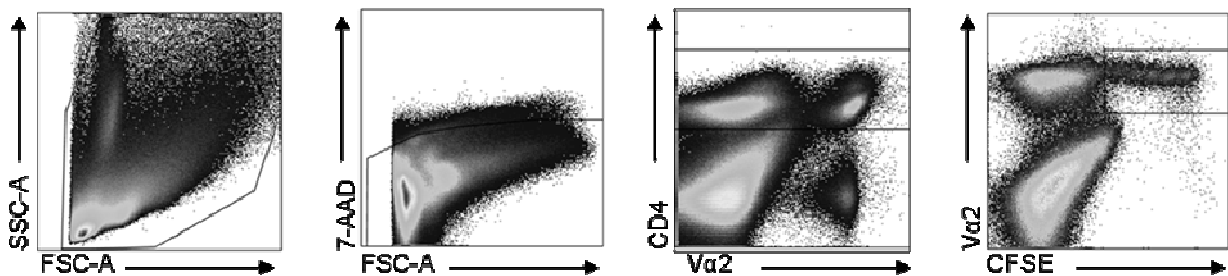


Abb. 10: Gating-Strategie des T-Zell-Proliferationsassay

Die Abbildung zeigt die Gating-Strategie einer Messung, wobei zuerst die Population aufgrund der Morphologie (FSC/SSC) identifiziert wurde und anschließend wurden die toten Zellen mittels 7-AAD Färbung ausgeschlossen. Die lebenden Zellen wurden auf die Expression von CD4⁺ und Va2⁺ Zellen begrenzt und innerhalb dieser Population der Anteil an CFSE-markierten T-Zellen bestimmt.

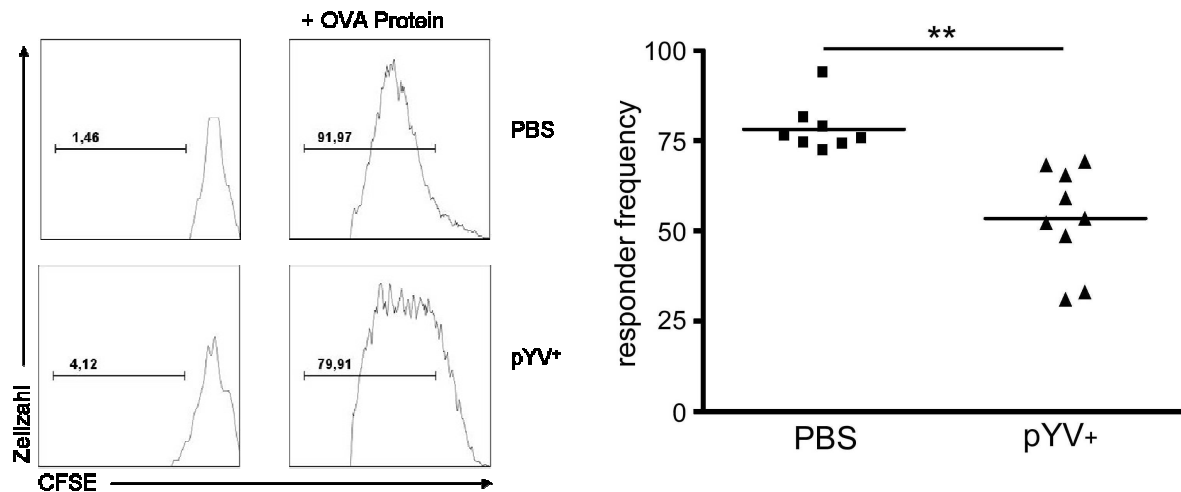


Abb. 11: Auswertung der T-Zellproliferation *in vivo*

CFSE-markierte T-Lymphozyten einer OT-II transgenen Maus wurden in PBS-behandelte bzw. mit Yersinien-infizierte C57BL/6 Mäuse adoptiv transferriert. Ein Tag nach Infektion wurde OVA-Protein iv appliziert und die Proliferation der CD4⁺T-Zellen nach drei Tage anhand der CFSE-Verteilung bestimmt. Histogramme zeigen die CFSE-Verteilung bei PBS-behandelten und Yersinien-infizierten Mäusen (links). Das Diagramm zeigt die „responder frequency“ von CD4⁺T-Zellen von PBS-behandelten und Yersinien-infizierten Mäusen (rechts). Daten sind von 3 Experimenten mit je 3 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

4.1.2 T-Zell-Proliferation *ex vivo*

Um die Rolle der DC-Subpopulation zu untersuchen, die für die Beeinträchtigung der T-Zell-Aktivierung verantwortlich ist, wurden DC-Subpopulationen von Ye infizierten Mäusen und Kontrollmäusen isoliert und anschließend mit CFSE-markierten T-Zellen von OT-II Mäusen in Gegenwart von OVA-Protein oder OVA-Peptid kokultiviert. Nach 72-stündiger Kultur wurde die T-Zell-Proliferation durchflusszytometrisch anhand der CFSE-Verteilung ermittelt (Strategie des Versuches siehe Abb. 12).

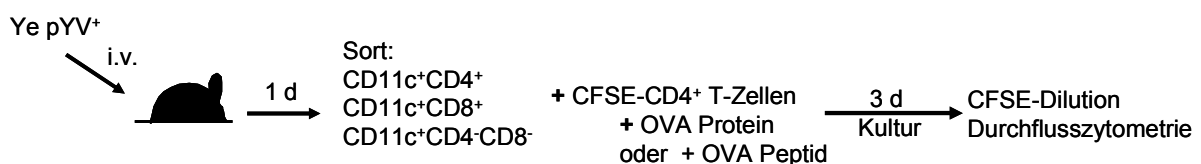


Abb. 12: Experimentelle Strategie zur Analyse der T-Zell-Proliferation *ex vivo*

In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die T-Zell-Proliferation in der Ko-kultur mit $CD8\alpha^+$ DCs aus Yersinien-infizierten Mäusen unter dem Einsatz von OVA-Protein signifikant reduziert ist im Vergleich zu den $CD8\alpha^+$ DCs aus PBS-behandelten Mäusen (Abb. 13). Es konnten keine Unterschiede in der T-Zell-Proliferation in der Kokultur mit $CD4^+$ DCs und DN DCs aus den Kontrollmäusen und Yersinien-infizierten Mäusen beobachtet werden. In den analogen Experimenten mit Kokulturen mit OVA-Peptid wurde kein Effekt der Yersinien auf die T-Zell-Proliferation ermittelt (Abb. 14). Mit diesen Experimenten wurde also gezeigt, dass die Hemmung der T-Zell-Aktivierung hauptsächlich durch die Beeinträchtigung der $CD8\alpha^+$ DCs durch Ye vermittelt wird.

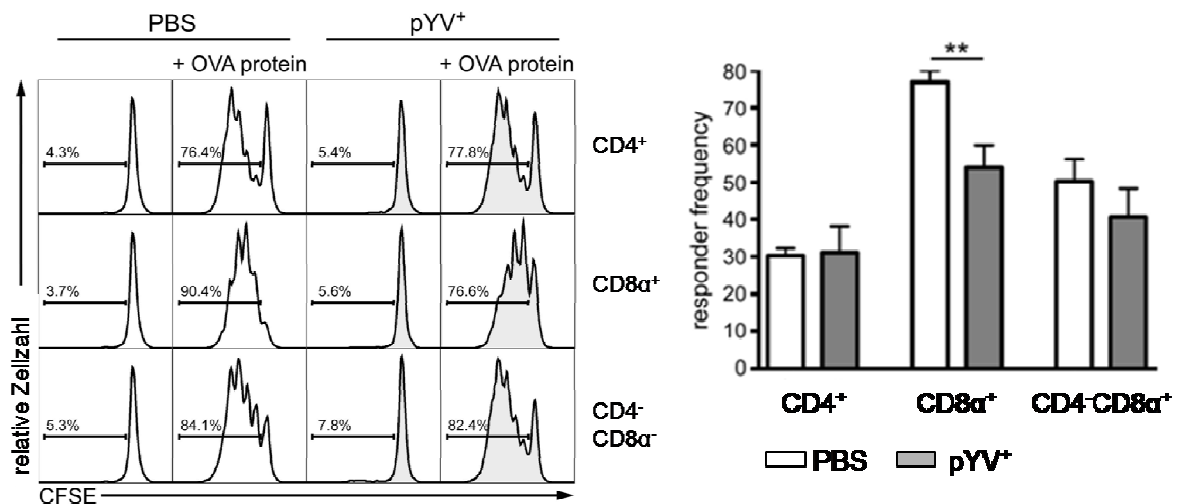


Abb. 13: Analyse der T-Zell-Proliferation ex vivo (OVA-Protein)

CFSE-markierte T-Lymphozyten einer OT-II transgenen Maus wurden mit OVA-Protein inkubiert. Die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen wurde nach 72 h durch die CFSE-Verteilung mittels Durchflusszytometer bestimmt. Histogramme zeigen die CFSE-Verteilung der T-Zellen mit isolierten $CD4^+$ DCs, $CD8\alpha^+$ DCs und DN DCs aus PBS-behandelten (weiß) und Yersinien-infizierten (grau) Mäusen (links). Das Diagramm zeigt die „responder frequency“ von $CD4^+$ T-Zellen von PBS-behandelten (weiß) und Yersinien-infizierten (grau) Mäusen (rechts). Daten sind von zwei unabhängigen Experimenten. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

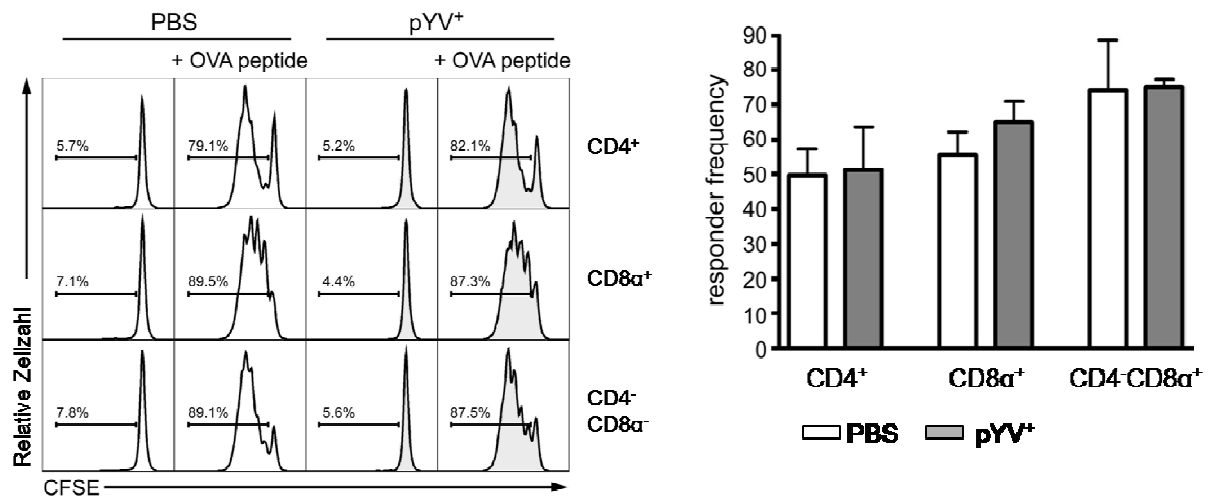


Abb. 14: Analyse der T-Zell-Proliferation ex vivo (OVA-Peptid)

CFSE-markierte T-Lymphozyten einer OT-II transgenen Maus wurden mit OVA-Peptid inkubiert. Die Proliferation der CD4+T-Zellen wurde nach 72 h durch die CFSE-Verteilung mittels Durchflusszytometer bestimmt. Histogramme zeigen die CFSE-Verteilung der T-Zellen mit isolierten CD4+DCs, CD8α+DCs und DN DCs aus PBS-behandelten (weiß) und Yersinien-infizierten (grau) Mäusen (links). Das Diagramm zeigt die „responder frequency“ von CD4+T-Zellen von PBS-behandelten (weiß) und Yersinien-infizierten (grau) Mäusen (rechts). Daten sind von zwei unabhängigen Experimenten. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

4.1.3 Antigenaufnahme und –prozessierung nach Infektion mit Ye

Die Ergebnisse der T-Zell-Proliferation *in vivo* und *ex vivo* deuten darauf hin, dass die Antigenaufnahme und/oder Antigenprozessierung durch Yersinien gehemmt werden könnte. Um zu analysieren, ob diese beiden Prozesse durch eine Infektion mit Ye beeinträchtigt werden, wurden C57BL/6 Mäuse mit 5×10^4 Ye infiziert und ein bzw. drei Tage nach Infektion wurde OVA-Alexa647 und OVA-DQ i.v. appliziert. OVA-DQ ist ein selbstquenches Konjugat aus Ovalbumin und dem grün fluoreszierenden Fluorochrom BODIPYFL. Die Degradation eines Proteins vereinzelt („entquencht“) die Fluorochrome, so dass die Fluoreszenzemission im Durchflusszytometer gemessen werden kann. Eine Stunde nach der Applikation von OVA-Alexa647 und OVA-DQ wurde die Milz entnommen und die DCs im Durchflusszytometer analysiert. Experimentelles Schema siehe Abb. 15.

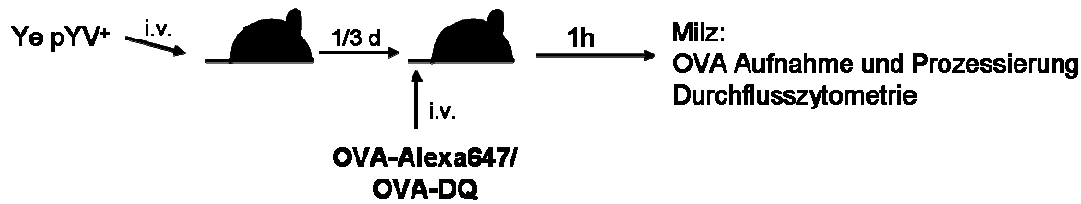


Abb. 15: Experimentelle Strategie zur Analyse der Antigenaufnahme und -Prozessierung

Es ist bekannt, dass die CD8 α ⁺DCs eine höhere Kapazität in der Antigenaufnahme besitzen [56]. CD8 α ⁺DCs aus PBS-behandelten Mäusen haben eine höhere Aufnahme an AlexaFluor647-markiertem OVA-Protein als die beiden anderen DC-Subpopulationen. Bei einer Infektion mit Ye nehmen die CD8 α ⁺DCs nach einem Tag etwa 20 % und nach drei Tagen etwa 80 % weniger AlexaFluor647 OVA-Protein auf als die CD8 α ⁺DCs von PBS-behandelten Mäusen. Die CD4⁺DCs sowie die DN DCs nehmen dagegen an Tag drei das Doppelte bzw. das Vierfache an OVA-Protein auf (Abb. 16 und 17).

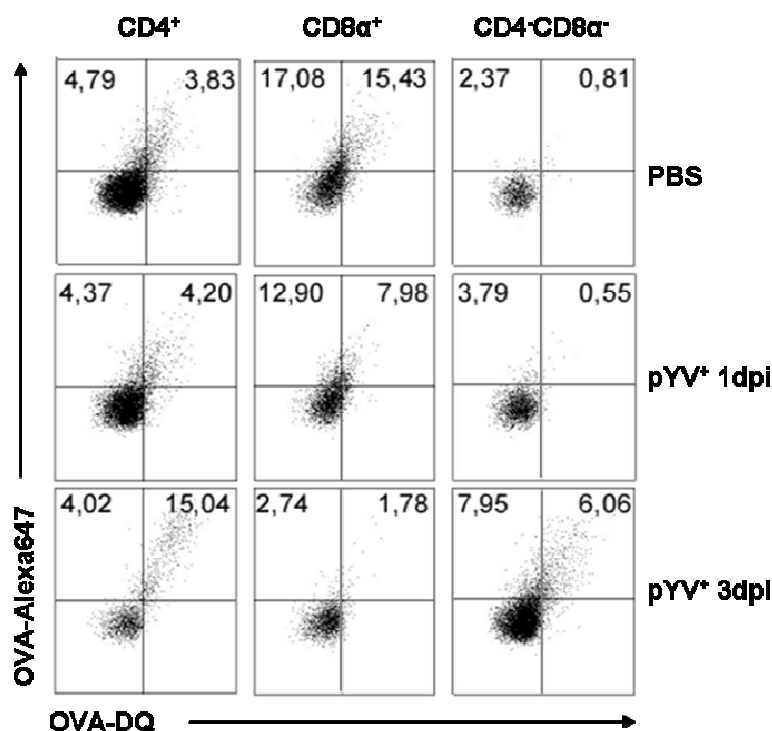


Abb. 16: FACS-Analyse der Antigenaufnahme und -prozessierung von DCs

C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^4 Ye i.v. infiziert bzw. wurde PBS injiziert. 24 h und drei Tage nach Infektion wurde OVA-Alexa647 und OVA-DQ i.v. appliziert und eine Stunde wurde die Antigenaufnahme und Antigenprozessierung im Durchflusszytometer analysiert. Dot plots zeigen AlexaFluor647⁺ und DQ-OVA⁺ DC Subpopulationen von PBS behandelten und Ye-infizierten C57BL/6 Mäusen (1 und 3 dpi).

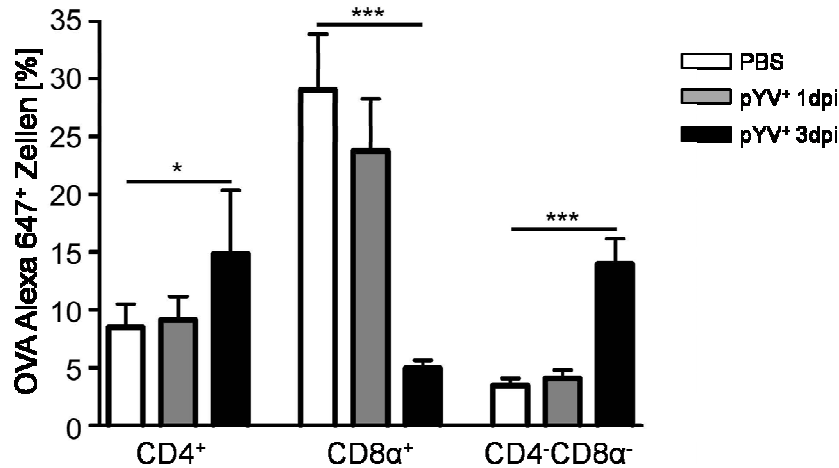


Abb. 17: Antigenaufnahme der DC-Subpopulationen *in vivo*

Die Graphik zeigt AlexaFluor647⁺DC Subpopulationen von PBS behandelten (weiße Balken) und Ye-infizierten (1 dpi: graue Balken und 3 dpi: schwarze Balken) C57BL/6 Mäusen. Daten sind repräsentativ für 2 Experimente mit 5 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

Die Analyse der Antigenprozessierung mittels OVA-DQ Injektion lieferte vergleichbare Ergebnisse wie die Antigenaufnahme. Im Verlauf der Infektion erfolgt eine signifikante Abnahme in der Antigenprozessierung bei den CD8α⁺DCs und eine signifikante Zunahme bei den CD4⁺DCs und DN DCs (Abb. 16 und Abb. 18). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Ye vor allem die Antigenaufnahme und die Antigenprozessierung von CD8α⁺DCs hemmt.

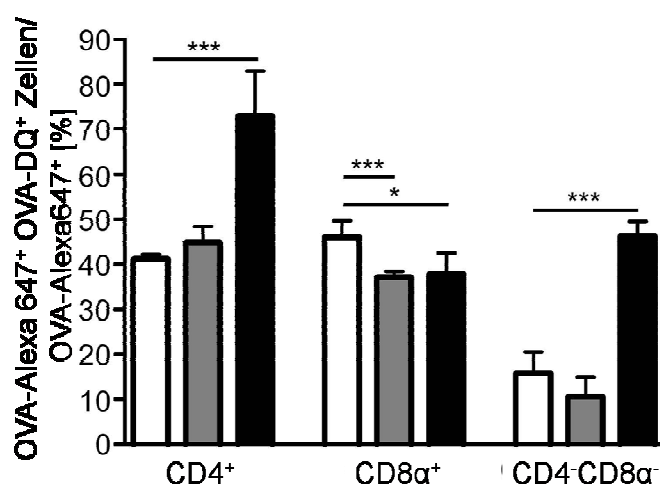


Abb. 18: Antigenprozessierung der DC-Subpopulationen *in vivo*

Die Graphik zeigt den prozentualen Anteil an AlexaFluor647⁺DQTM-OVA⁺ Zellen bezogen auf alle AlexaFluor647⁺Zellen von PBS (weiße Balken) behandelten und Ye-infizierten C57BL/6 Mäusen (1 dpi: graue Balken und 3 dpi: schwarze Balken). Daten sind repräsentativ für aus 2 Experimente mit 5 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

4.1.4 Größe, Zellzahl und Bakterienanzahl der Milz nach Infektion mit Ye

Nach einer Infektion mit Ye konnte eine Zunahme in Größe und Gewicht der Milzen in C57BL/6, TLR2^{-/-}x4^{-/-}, MyD88^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäusen beobachtet werden (Abb. 19 und Abb. 22). Insbesondere konnte neben der auffälligen Gewichtszunahme der Milz eine Zunahme in der Gesamtzellzahl der Milz beobachtet werden (Abb. 20 und Abb. 23). In Abb. 21 ist die Zunahme der Bakterienzahl in C57BL/6 nach Infektion mit 5×10^4 Ye nach 1, 2 und 3 dpi zu sehen. Diese Zunahme der Zellzahl war an Tag drei nach Infektion in allen Mausstämmen sehr ausgeprägt und korrelierte mit der hohen bakteriellen Last in der Milz. Aufgrund der unterschiedlichen Suszeptibilität der Mäuse auf eine Yersinien-Infektion wurde zuerst die Infektionsdosis für jeden Mausstamm bestimmt, um vergleichbare Bakterienzahlen in der Milz zu erzielen (Abb. 24). Die Infektionsdosis der TLR2^{-/-}x4^{-/-}-Mäusen betrug 5×10^3 , MyD88^{-/-}-Mäuse 5×10^2 und TRIF^{-/-}-Mäuse 5×10^4 Ye. Die Zunahme der Milzgröße und Gesamtzellzahl ist nicht durch eine Zunahme an DCs in der Milz bedingt.

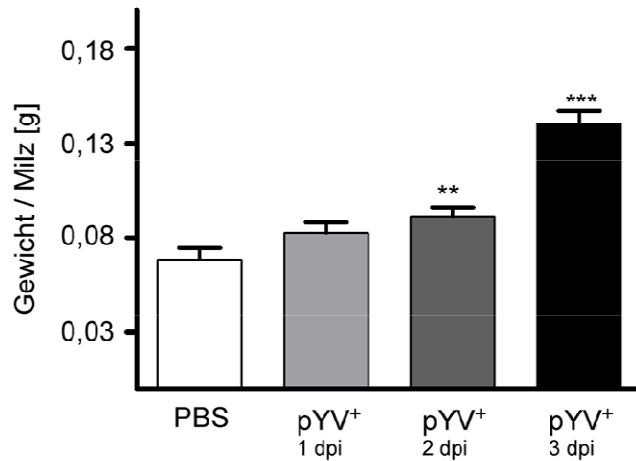


Abb. 19: Gewichtszunahme der Milz von C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit Ye

Die Mäuse wurden mit 5×10^4 Ye pYV⁺ 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 dargestellt. Weißer Balken: PBS-behandelt; hellgrauer Balken: 1 dpi; dunkelgrauer Balken: 2 dpi; schwarzer Balken: 3 dpi. Daten sind repräsentativ aus 3 Experimenten mit mind. 3 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

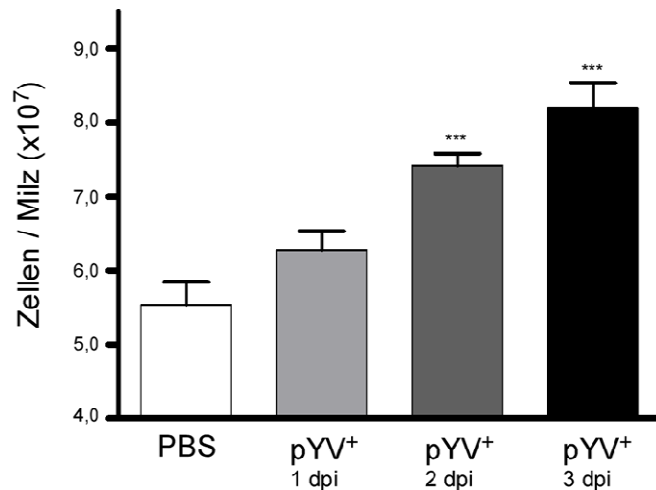


Abb. 20: Anstieg der Zellzahl in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit Ye

C57BL/6-Mäuse wurden mit 5×10^4 Ye i.v. infiziert und nach angegebenen Zeitpunkten getötet, die Milz entnommen, homogenisiert und die Zellzahl bestimmt. Weißer Balken: PBS-behandelt; hellgrauer Balken: 1 dpi; dunkelgrauer Balken: 2 dpi; schwarzer Balken: 3 dpi. Daten sind repräsentativ aus 3 Experimenten mit mind. 3 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

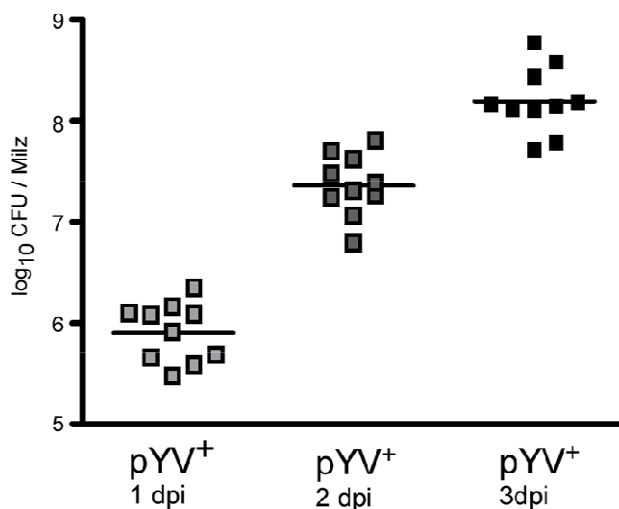


Abb. 21: Bakterienzahlen in der Milz in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit Ye

C57BL/6-Mäuse wurden mit 5×10^4 Ye i.v. infiziert und nach angegebenen Zeitpunkten getötet, die Milz entnommen, homogenisiert und auf MH-Platten ausplattiert um die CFU zu ermitteln. Dargestellt sind Keimzahlen / Milz einzelner Mäuse nach 1 dpi (hellgrau), 2 dpi (dunkelgrau) und 3 dpi (schwarz). Daten sind repräsentativ aus 3 Experimenten mit mind. 3 Mäusen pro Gruppe.

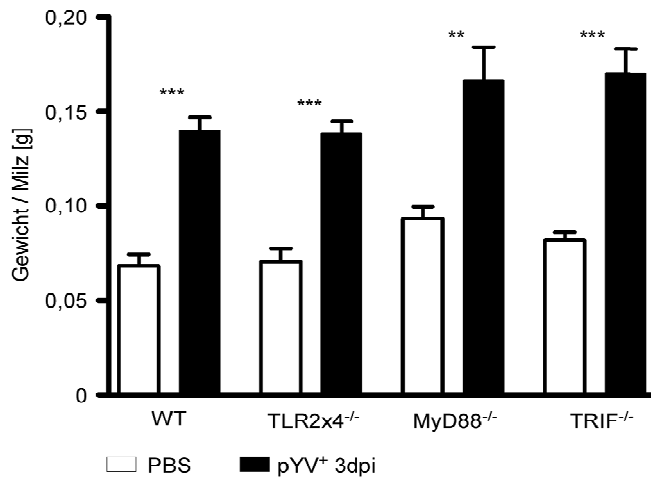


Abb. 22: Gewichtszunahme in C57BL/6, TLR2^{-/-}/4^{-/-}, MyD88^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäusen nach Infektion mit Ye

Die Mäuse wurden mit Ye pYV⁺ i.v. infiziert und 3 Tage nach Infektionsbeginn getötet. Die Milzen wurden entnommen und auf einer Feinwaage gewogen. Das Milzgewicht ist in Gramm dargestellt. Weiße Balken: PBS-behandelt; schwarze Balken: 3 dpi. Daten sind repräsentativ aus 4 Experimenten mit mind. 3 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

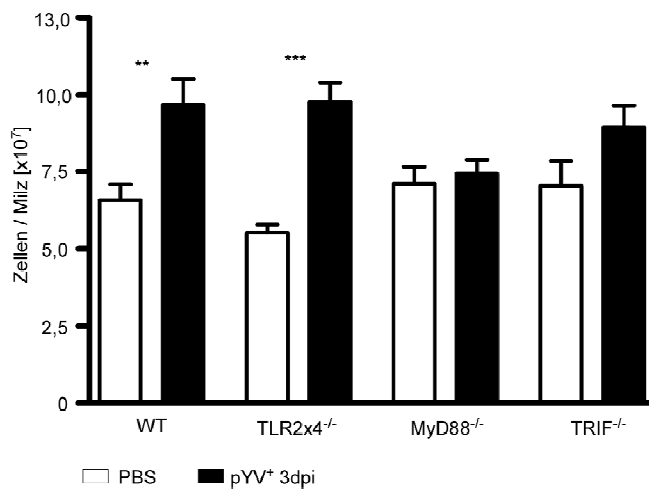


Abb. 23: Gesamtzellzahl in der Milz von C57BL/6, TLR2^{-/-}/4^{-/-}, MyD88^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäusen nach Infektion mit Ye

Mäuse wurden mit Ye i.v. infiziert und 3 Tage nach Infektionsbeginn getötet, die Milz entnommen, homogenisiert und die Zellzahl bestimmt. Weiße Balken: PBS-behandelt; schwarze Balken: 3 dpi. Im Verlauf der Infektion nimmt die Zellzahl bei den Wildtyp-Mäusen und TLR2^{-/-}x4^{-/-} in der Milz zu. Daten sind repräsentativ aus 4 Experimenten mit mind. 3 Mäusen pro Gruppe.* präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

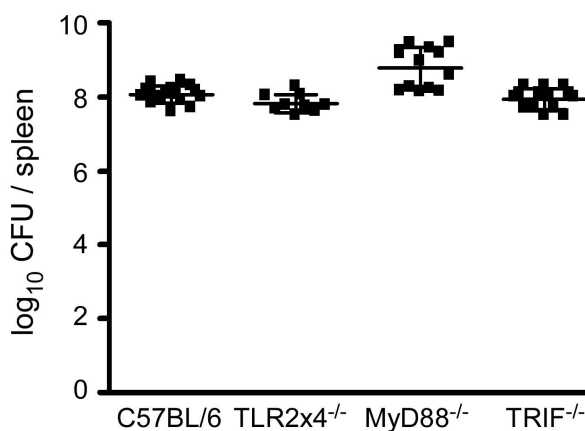


Abb. 24: Bakterienanzahl in C57BL/6, TLR2^{-/-}/4^{-/-}, MyD88^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäusen nach Infektion mit Ye

Mäuse wurden mit Ye i.v. infiziert, getötet, die Milz entnommen, homogenisiert und auf MH-Platten ausplattiert um die CFU zu ermitteln. Dargestellt sind Keimzahlen / Milz einzelner Mäuse 3 dpi. Daten sind repräsentativ aus 4 Experimenten mit mind. 3 Mäusen pro Gruppe.

4.1.5 Infektion mit Ye führt zu DC-Verlust in der Milz

De Trez et al. konnten einen Verlust der DC Subpopulationen in der Milz nach Infektion mit *E. coli in vivo* zeigen [141]. Um zu analysieren, ob eine Infektion mit Ye ebenfalls einen Veränderung in der Anzahl der DCs hervorruft, wurden C57BL/6 Mäuse 5×10^4 Ye i.v. appliziert, ein bis drei Tage nach Infektionsbeginn getötet und die DC-Subpopulationen durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend wurde die prozentuale und absolute Anzahl der DCs, sowie die Verteilung der DC-Subpopulationen bestimmt. Aus den Resultaten geht deutlich hervor, dass die Anzahl der DCs in der Milz um 25 % (von $2,2 \times 10^6$ in PBS-behandelten Mäusen auf $8,0 \times 10^5$ DCs in Yersinien-infizierten Mäusen an Tag 3) vermindert wird. Dabei nehmen $CD4^+$ DCs um 90 % und $CD8\alpha^+$ DCs um 65 % ab, hingegen die DN DCs zu, im Vergleich zu den PBS-behandelten Mäusen (Abb. 25, unten links). Absolut gesehen, nehmen die $CD4^+$ DCs von $1,1 \times 10^6$ auf $1,0 \times 10^5$ und die $CD8\alpha^+$ DCs $4,7 \times 10^5$ auf $1,7 \times 10^5$ Zellen in der Milz von Mäusen drei Tage nach Infektion ab im Vergleich zu den PBS-behandelten Mäusen. Interessanterweise steigt die absolute Zellzahl der DN DCs in der Milz im Verlauf der Infektion an (Abb. 25, unten rechts).

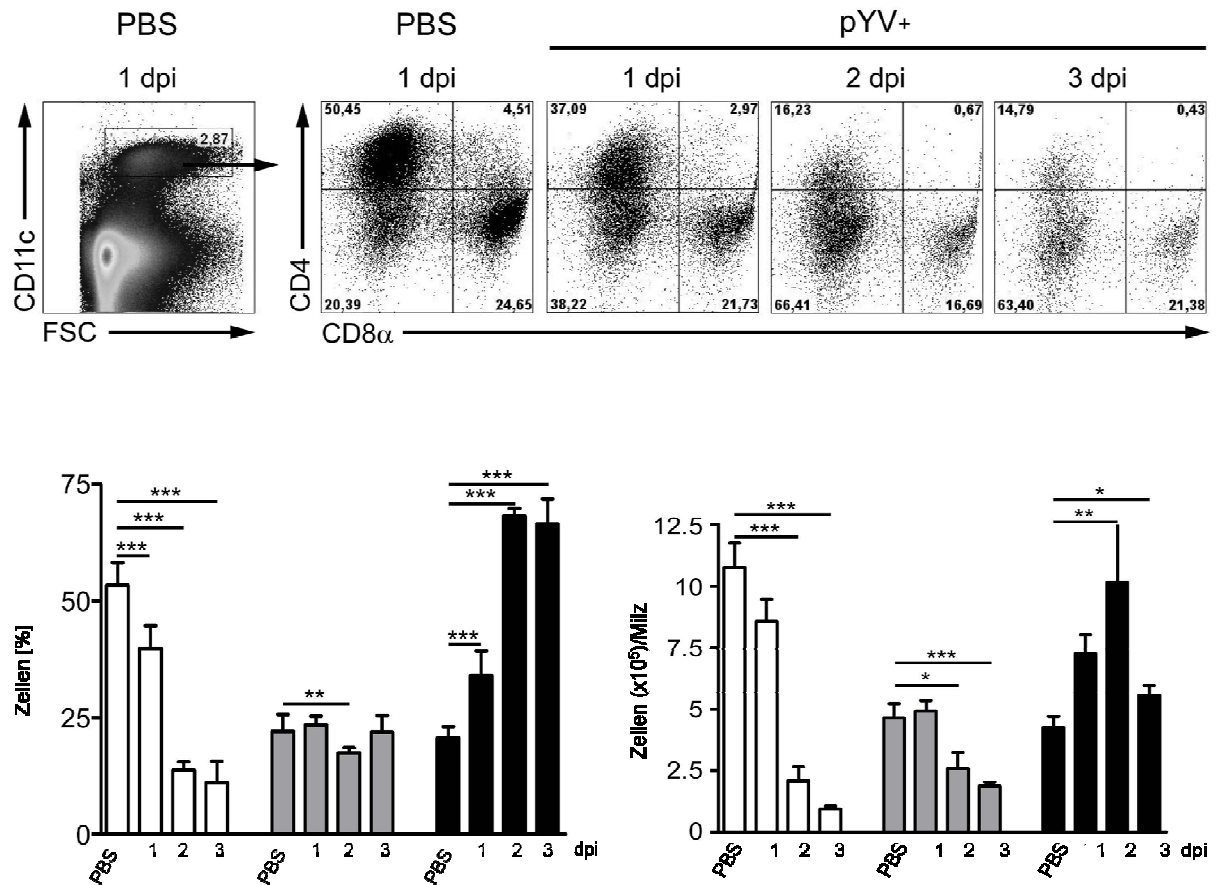


Abb. 25: Analyse der DC-Subpopulationen in C57BL/6-Mäuse im Verlauf der Infektion mit Ye

C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^4 Ye i.v. infiziert bzw. wurde PBS injiziert. Nach ein bis drei Tagen wurde die Milz entnommen, Einzelzellsuspensionen gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8 α , die toten Zellen mittels 7-AAD ausgeschlossen und die Anzahl der DC-Subpopulationen durchflusszytometrisch ermittelt. Die Dot plots (oben) zeigen die Gating-Strategie und den prozentualen Anteil der jeweiligen DC-Subpopulation im Verlauf der Infektion. Die Diagramme (unten) geben die DC-Subpopulationen in Prozent (links) und absoluter Zellzahl (rechts) an. CD4⁺DCs (weiße Balken), CD8 α ⁺DCs (graue Balken), DN DCs (schwarze Balken). Daten sind repräsentativ aus 5 Experimenten mit 5 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

Um zu klären, ob der Verlust der DCs TLR Signalweg vermittelt wird, wurden die DC-Subpopulationen in der Milz von TLR2^{-/-}x4^{-/-}, MyD88^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäusen während einer Infektion mit Ye analysiert. Dafür wurden die Mäuse mit verschiedenen Ye-Infektionsdosen i.v. infiziert, um vergleichbare Bakterienzahlen in der Milz zu bekommen (siehe bitte 4.1.6). Nach drei Tage wurden die Milzzellen durchflusszytometrisch auf die Anzahl der DCs analysiert. Eine vergleichbare Abnahme von CD4⁺DCs und CD8 α ⁺DCs konnte in MyD88^{-/-} Mäusen und Wildtypmäusen ermittelt werden. Ein anderes Bild zeigte sich in den TLR2^{-/-}x4^{-/-} und

TRIF^{-/-} Mäusen. Drei Tage nach Infektion mit Ye konnte in TLR2^{-/-}x4^{-/-} Mäusen keine Abnahme der DC-Subpopulationen festgestellt werden, sondern sogar eine signifikante Zunahme an CD8α⁺DCs und DN DCs im Vergleich zu PBS-behandelten TLR2^{-/-}x4^{-/-} Mäusen. Bei Mäusen, bei denen der TRIF-Signalweg blockiert ist, konnte keine Abnahme von CD4⁺DCs und CD8α⁺DCs, jedoch eine Zunahme an DN DC ermittelt werden (Abb. 31). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der Verlust der CD4⁺DCs und CD8α⁺DCs in Wildtyp-Mäusen durch die Infektion mit Ye über den TLR4-TRIF-Signalweg vermittelt wird.

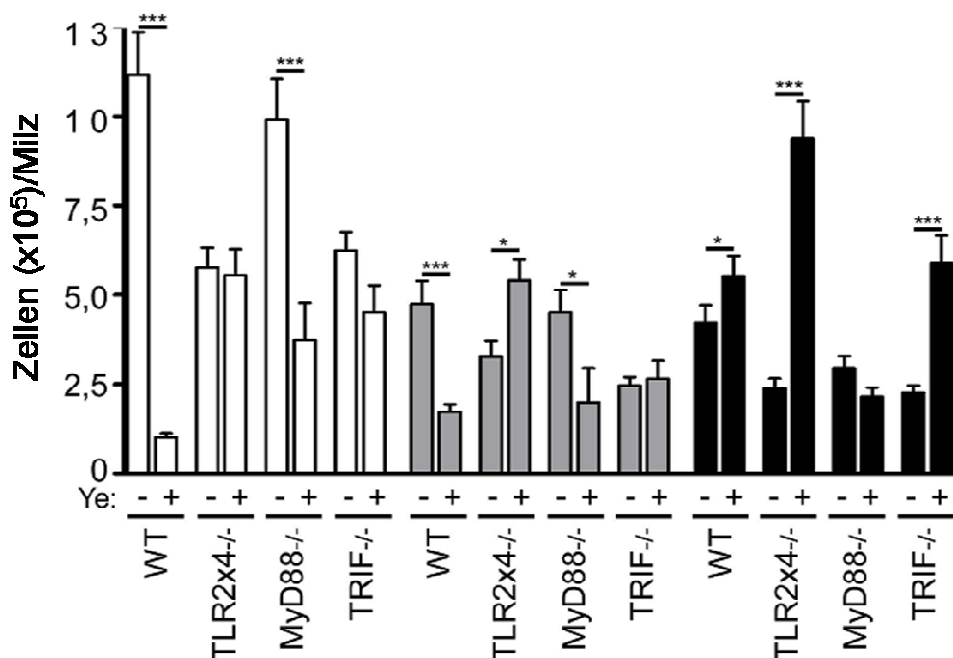


Abb. 26: Analyse der DC-Subpopulationen im Verlauf der Infektion mit Ye

Mäuse wurden mit Ye i.v. infiziert bzw. wurde PBS injiziert. Nach drei Tage wurde die Milz entnommen, die Zellen gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8α, die toten Zellen mittels 7-AAD ausgeschlossen und die Anzahl der DC-Subpopulationen durchflusszytometrisch ermittelt. Die absolute Zellzahl der DC-Subpopulationen in der Milz ist dargestellt. CD4⁺DCs (weiße Balken), CD8α⁺DCs (graue Balken) DN DCs (schwarze Balken). Erläuterungen siehe bitte Text. Daten sind repräsentativ aus 3 Experimenten mit mind. 3 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

4.1.6 Nekrose und Apoptose von DCs nach Infektion mit Ye

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, wurde in Experimenten mit LPS-behandelten bzw. *E. coli*-infizierten Mäusen ein Verlust an CD4⁺DCs und CD8α⁺ DCs in der Milz gezeigt. Der Verlust konnte durch Zelltod (Nekrose) und Apoptose (programmierter Zelltod) erklärt werden. Dieser Prozess wird durch TLR4 und dem TRIF-Signalweg vermittelt [141,161]. Daher stellt sich hier die Frage, ob Ye den Zelltod von DC-Subpopulationen *in vivo* induziert und damit der Verlust der CD4⁺DCs und CD8α⁺DCs erklärt werden kann. Zum Nachweis des Zelltodes wurden die DC-Subpopulationen aus PBS-behandelten bzw. Ye-infizierten Mäusen mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. 7-AAD ist ein selbstfluoreszierender Farbstoff, der mit der DNS interkaliert; spezifisch zwischen Cytosin und Guanin. Eine wichtige Eigenschaft von 7-AAD ist, dass ausschließlich die DNS von toten Zellen gefärbt werden, da 7-AAD nur in Zellen mit geschädigter Zellwand diffundieren kann [162]. Der prozentuale Anteil an 7-AAD⁺CD4⁺DCs steigt von 10 % in Kontrollmäusen auf etwa 45-65 % in Yersinien-infizierten Mäusen drei Tage nach Infektionsbeginn (Abb. 27 und Abb. 28 links), wohingegen die absolute Zellzahl an 7-AAD⁺CD4⁺DCs keine Zunahme im Verlauf der Infektion zeigt (Abb. 28 rechts). Eine Erklärung hierfür ist, dass dies durch die extreme Abnahme an CD4⁺DCs 2 und 3 dpi verursacht wird. Eine ausgeprägte Veränderung weder in der prozentualen noch in der absoluten Zellzahl konnte bei 7-AAD⁺CD8α⁺DCs im Verlauf der Infektion mit Ye beobachtet werden (Abb. 27 und Abb. 28). Dagegen zeigte sich eine signifikante Zunahme an 7-AAD⁺DN DCs in Yersinien-infizierten Mäusen verglichen mit den PBS-behandelten Mäusen sowohl prozentual als auch in der absoluten Zellzahl (Abb. 28).

Analyse der 7-AAD⁺DCs in TLR2^{-/-}x4^{-/-}, MyD88^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäusen drei Tage nach Infektionsbeginn zeigten prozentual einen geringen Anstieg an toten CD4⁺DCs in TLR2^{-/-}x4^{-/-} und MyD88^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Abb.34). Weder eine Zunahme noch eine Abnahme an 7-AAD⁺Zellen konnte in den beiden anderen Populationen ermittelt werden im Vergleich zu den jeweiligen PBS-behandelten in TLR2^{-/-}x4^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen. Die Infektion mit Ye führte bei TRIF^{-/-} Mäusen zu einer Zunahme von 30 % an 7-AAD⁺CD4⁺DCs und zu einer Abnahme von ca. 5 % an 7-AAD⁺CD8α⁺DCs und 7-AAD⁺DN DCs im Vergleich zu den Subpopulationen von PBS-behandelten TRIF^{-/-} Mäusen (Abb. 34).

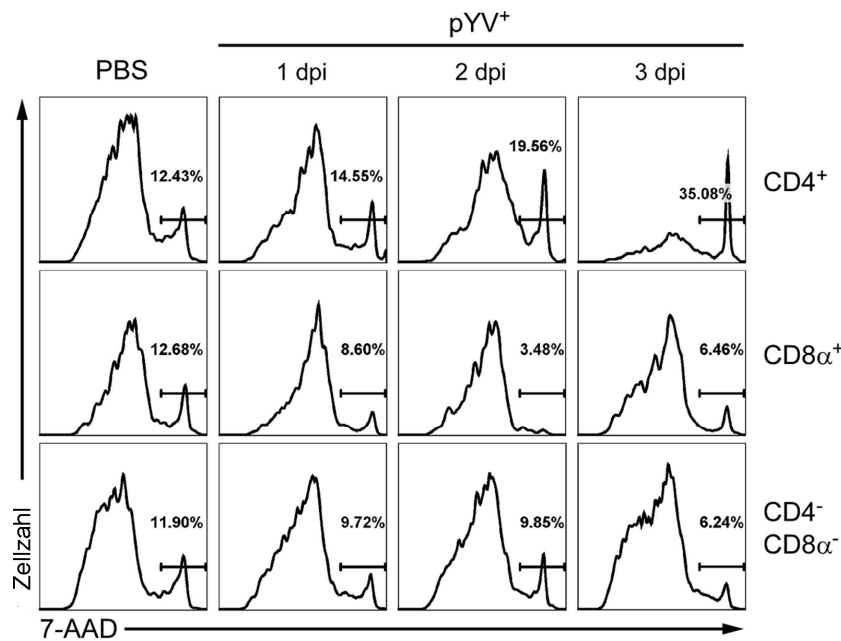


Abb. 27: Durchflusszytometrische Darstellung des Zelltodes mit 7-AAD in murinen DC-Subpopulationen

C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^4 Ye i.v. infiziert bzw. wurde PBS injiziert. Nach ein bis drei Tagen wurde die Milz entnommen, Einzelzellsuspensionen gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8α und der Anteil der toten Zellen mittels 7-AAD durchflusszytometrisch bestimmt. Die Histogramme zeigen die Gating Strategie und den prozentualen Anteil der jeweiligen DC-Subpopulation im Verlauf der Infektion.

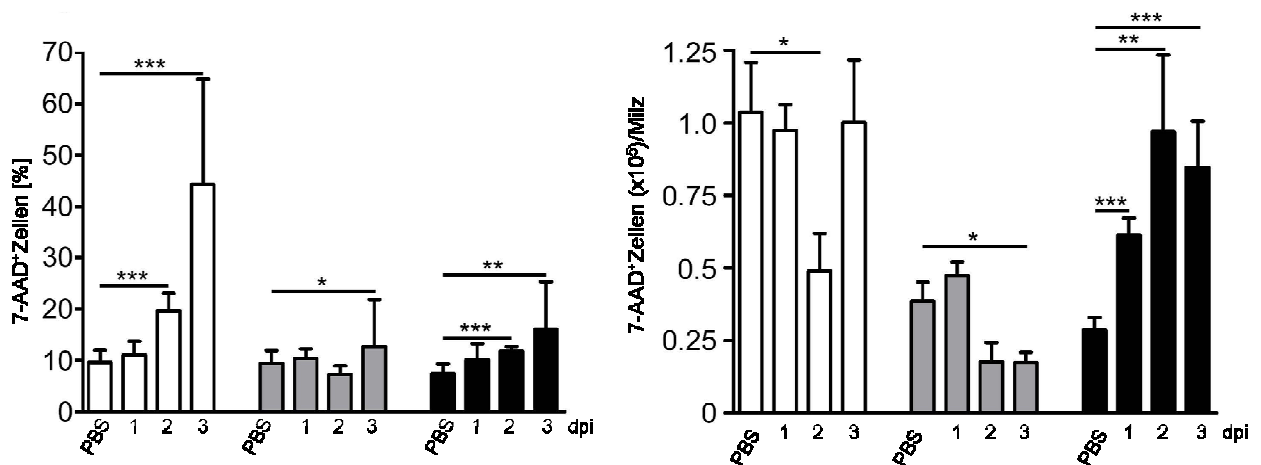


Abb. 28: Analyse des Zelltodes mit 7-AAD in C57BL/6 Mäuse im Verlauf der Infektion mit Ye

C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^4 Ye i.v. infiziert bzw. wurde PBS injiziert. Nach ein bis drei Tage wurde die Milz entnommen, Einzelzellsuspensionen gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8α und die toten Zellen durch 7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Diagramme geben in Prozent (links) und absoluter Zellzahl (rechts) den Zelltod der DC-Subpopulationen an. CD4⁺DCs (weiße Balken), CD8α⁺DCs (graue Balken), DN DCs (schwarze Balken). Daten sind repräsentativ für zwei Experimente mit 5 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

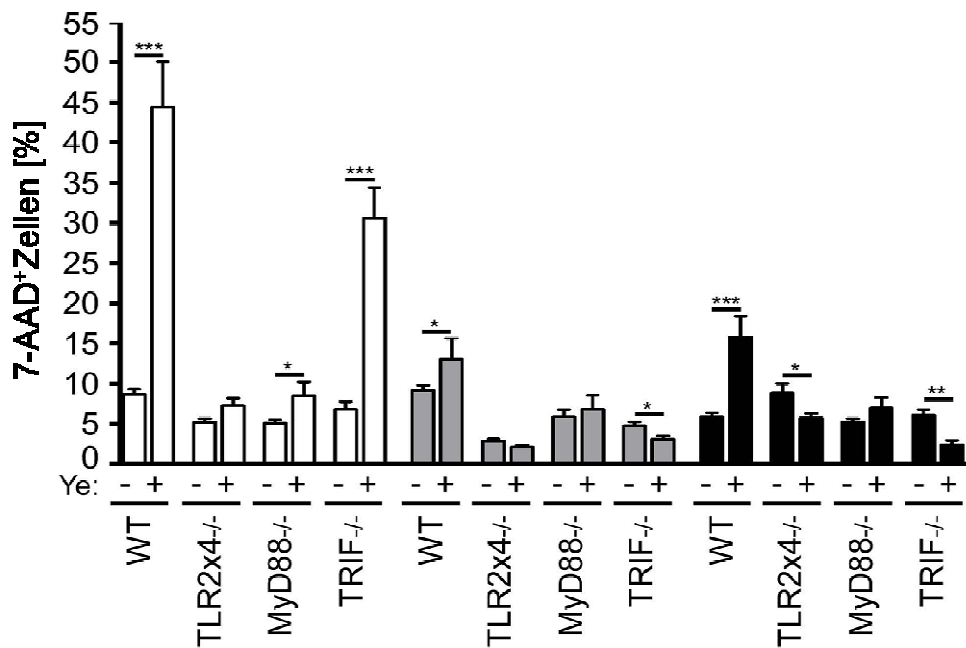


Abb. 29: Analyse des Zelltodes in Mäuse drei Tage nach Infektion mit Ye

Mäuse wurden mit Ye iv. infiziert bzw. wurde PBS injiziert. Nach drei Tagen wurde die Milz entnommen, Einzelzellsuspensionen gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8α und die toten Zellen durch 7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an 7-AAD⁺DC-Subpopulationen in der Milz von C57BL/6, TLR2^{-/-}x4^{-/-}, MyD88^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäusen. CD4⁺DCs (weiße Balken), CD8α⁺DCs (graue Balken), DN DCs (schwarze Balken). Daten sind repräsentativ für drei Experimente mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

Mehrere Arbeitsgruppen haben zeigen können, dass Ye Apoptose in Makrophagen und in DCs *in vitro* induziert [129,131,136]. Die Induktion der Apoptose durch Ye könnte eine Ursache des Verlustes von CD4⁺DCs und CD8α⁺DCs sein. Bei der Apoptose nimmt die Zelle im Gegensatz zur Nekrose (Zelltod) bei ihrem Abbauprozess aktiv teil. Die Veränderung der Zellen während des programmierten Zelltod kann durch phänotypische Merkmale definiert werden. Die Zelle schrumpft, die DNS wird kondensiert und degradiert, Mitochondrien werden abgebaut und letztendlich wird die Zelle in sogenannte apoptotische Körperchen fragmentiert, die von Phagozyten entfernt werden. Die biochemische Veränderung einer apoptotischen Zelle zeigt sich in der Aktivierung einer Kaskade von zytosolischen Proteasen - den Caspasen, welche die Apoptose kontrollieren und regulieren. Für diese Fragestellung wurden die Milzzellen aus PBS behandelte bzw. mit Yersinien-infizierten Mäuse mit dem Caspase3/7 FLICA Apoptosis Detection Kit (serotec) gefärbt. Dabei werden die aktivierten Caspasen 3 und 7 mit einem

Fluoreszenzfarbstoff markiert, welche anschließend im Durchflusszytometer detektiert werden können. Um die schon nekrotischen Zellen auszuschließen, wurden die Zellen zusätzlich mit 7-AAD gefärbt (Abb. 30). Im Gegensatz zur Nekrose wird die Zellmembran bei der Apoptose nicht zerstört; somit ist eine Unterscheidung von Nekrose und Apoptose durch 7-AAD und der Färbung von Caspasen möglich. Dabei sind intakte Zellen auf beide Färbungen negativ, frühapoptotische Zellen sind positiv für die Caspase3/7 Färbung, jedoch negativ auf die mit 7-AAD, nekrotische Zellen reagieren positiv auf die Färbung mit 7-AAD, jedoch negativ für Caspase3/7. Eine signifikante Zunahme der Apoptoserate wurde in allen drei DC-Subpopulationen 24 h nach Infektion mit Ye im Vergleich zu den Kontrollmäusen beobachtet (Abb. 31). Dabei zeigten die CD4⁺DCs eine prozentualer Zunahme an aktivierten Caspasen3/7 von ca. 10 %, CD8 α ⁺DC von ca. 5 % und DN DCs von ca. 10 %. Drei Tage nach Infektion nahm der prozentuale Anteil der Caspase3/7⁺CD4⁺DCs um ca. 15 % zu im Vergleich zu den CD4⁺DCs aus PBS behandelten Mäusen. Im Kontrast dazu nahm der Caspase3/7⁺ Anteil bei den CD8 α ⁺DCs und DN DC drei Tage nach Infektion ab auf den Wert der Kontrollmäuse (Abb. 31 links). Die absolute Zellzahl an Caspase3/7⁺ DC Subpopulationen zeigte ebenfalls eine signifikante Zunahme 24 h nach Infektion im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Abb. 31, rechts). Vor allem die CD4⁺DCs und DN DCs zeigten eine Zunahme von ca. $0,5 \times 10^5$ auf ca. $2,5 \times 10^5$ Caspase3/7⁺Zellen. Drei Tage nach Infektionsbeginn verminderte sich die Anzahl an apoptotischen CD4⁺DCs und CD8 α ⁺ DCs aus Yersinien-infizierten Mäusen auf den Wert der Kontrollmäuse (Abb. 31 rechts). Die Anzahl der Caspase-aktivierten DN DCs war an Tag drei nach Infektionsbeginn immer noch signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollmäusen.

Die Ergebnisse der Zelltod-Analyse führen zu dem Schluss, dass Ye den Zelltod von DN DCs und CD4⁺DCs induziert, wobei es nicht zu einer Abnahme an lebenden DN DCs führt. Weiterhin konnte eine prozentuale Zunahme an toten CD4⁺DCs und CD8 α ⁺DCs beobachtet werden, jedoch nicht in der Anzahl 7-AAD⁺Zellen. Der Verlust der CD4⁺DCs ist beträchtlich höher als CD4⁺7-AAD⁺DCs im Verlauf der Infektion mit Ye, so dass der Zelltod keine ausreichende Erklärung dafür sein kann. Die Ergebnisse der Zelltod-Analyse in den Knock-out Mäusen deutet darauf hin, dass die leicht erhöhte Zelltodrate der CD4⁺DCs in TLR2^{-/-}x4^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen durch den MyD88-Signalweg während einer Yersinien-Infektion vermittelt wird. Zusammenfassend konnte ein Einfluss von Ye auf den Zelltod und den

programmierten Zelltod der DC-Subpopulationen in der Milz während der Infektion mit Ye beobachtet werden. Jedoch kann der Verlust der CD4⁺DCs und CD8a⁺DCs in der Milz nicht hauptsächlich durch die Induktion der Nekrose und/oder der Apoptose durch Yersinien erklärt werden.

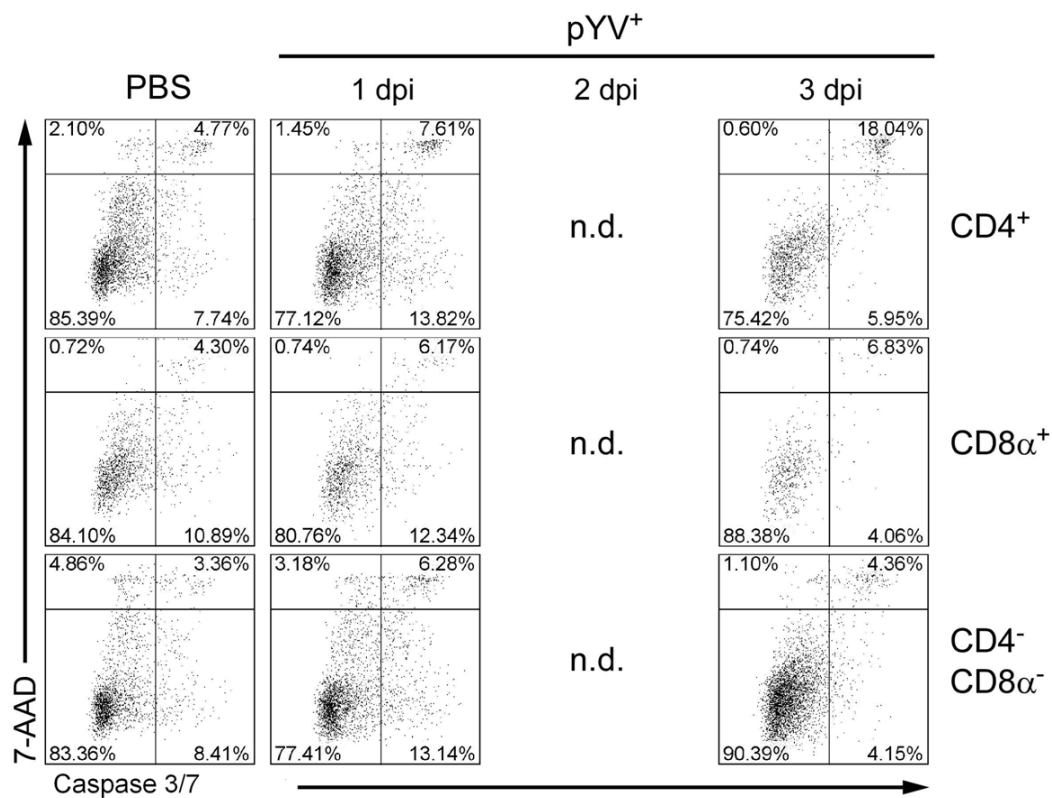


Abb. 30: Durchflusszytometrische Darstellung der Apoptose in DC-Subpopulationen

C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^4 Ye i.v. infiziert bzw. PBS injiziert. Nach ein und drei Tagen wurde die Milz entnommen, gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8α und der Anteil der Apoptose mittels Caspase3/7-Markierung durchflusszytometrisch bestimmt. Um die toten Zellen auszuschließen, wurde mit 7-AAD gefärbt. Die Dotplots zeigen die Gating Strategie und den prozentualen Anteil der jeweiligen Caspase3/7⁺DC-Subpopulation im Verlauf der Infektion mit Ye.

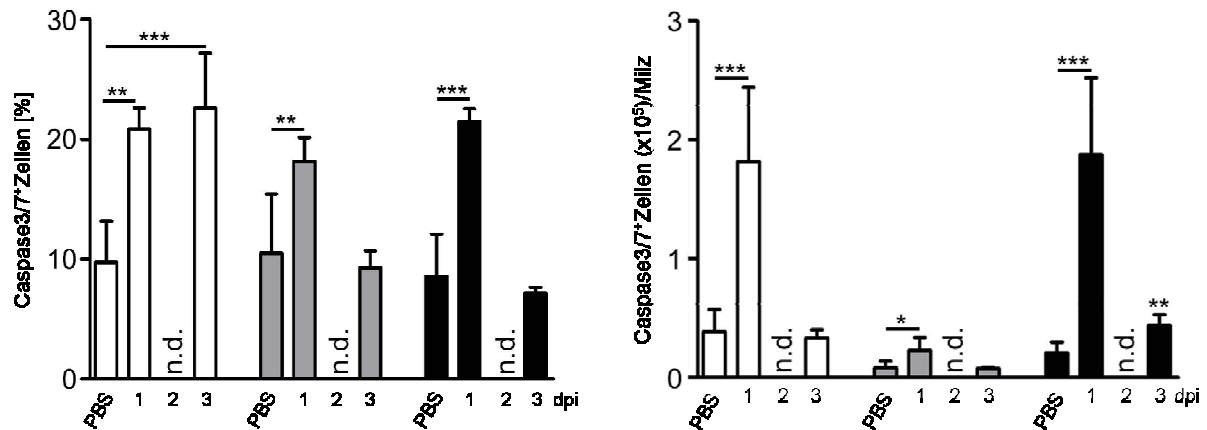


Abb. 31: Analyse apoptotischen DC-Subpopulationen in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit Ye

Mäuse wurde mit Ye i.v. infiziert bzw. PBS injiziert. Nach ein und drei Tagen wurde die Milz entnommen, die Zellen gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8 α und der Anteil der Apoptose mittels Caspase3/7-Markierung durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind der prozentuale Anteil (rechts) und die absolute Zellzahl von apoptotischen DC-Subpopulationen. CD4⁺DCs (weiße Balken), CD8 α ⁺DCs (graue Balken), DN DCs (schwarze Balken). Daten sind repräsentativ für zwei Experimente mit 5 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

4.1.7 Expression der DC-Oberflächenmarker CD4 und CD8 α nach Infektion mit Ye

Die zuvor beschriebenen Experimente zeigten, dass die Infektion mit Ye zu einem ausgeprägten Verlust an CD4⁺ DCs und CD8 α ⁺DCs in der Milz führt und weder Nekrose noch Apoptose eine entscheidende Rolle dabei spielen. Es ist naheliegend, hinter diesem Effekt eine „Downregulation“ der Oberflächenmoleküle CD11c, CD4 und CD8 α auf den DCs zu vermuten. Um zu untersuchen, ob die Expression der Oberflächenmoleküle auf Milz-DCs nach *in-vitro* Infektion mit Ye herunterreguliert wird, wurden Milzzellen *in vitro* mit dem Wildtypstamm von Ye mit einer MOI von 10 und 1 für 4 h bzw. 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der DC-Subpopulationen. Der prozentuale Anteil der CD4⁺DCs und der CD8⁺DCS ändert sich durch die Infektion mit Ye *in vitro* nicht. Somit kann die Erklärung für den Verlust der CD4⁺DCs und der CD8 α ⁺DCs durch Herunterregulation der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 nach einer Infektion *in vivo* ausgeschlossen werden.

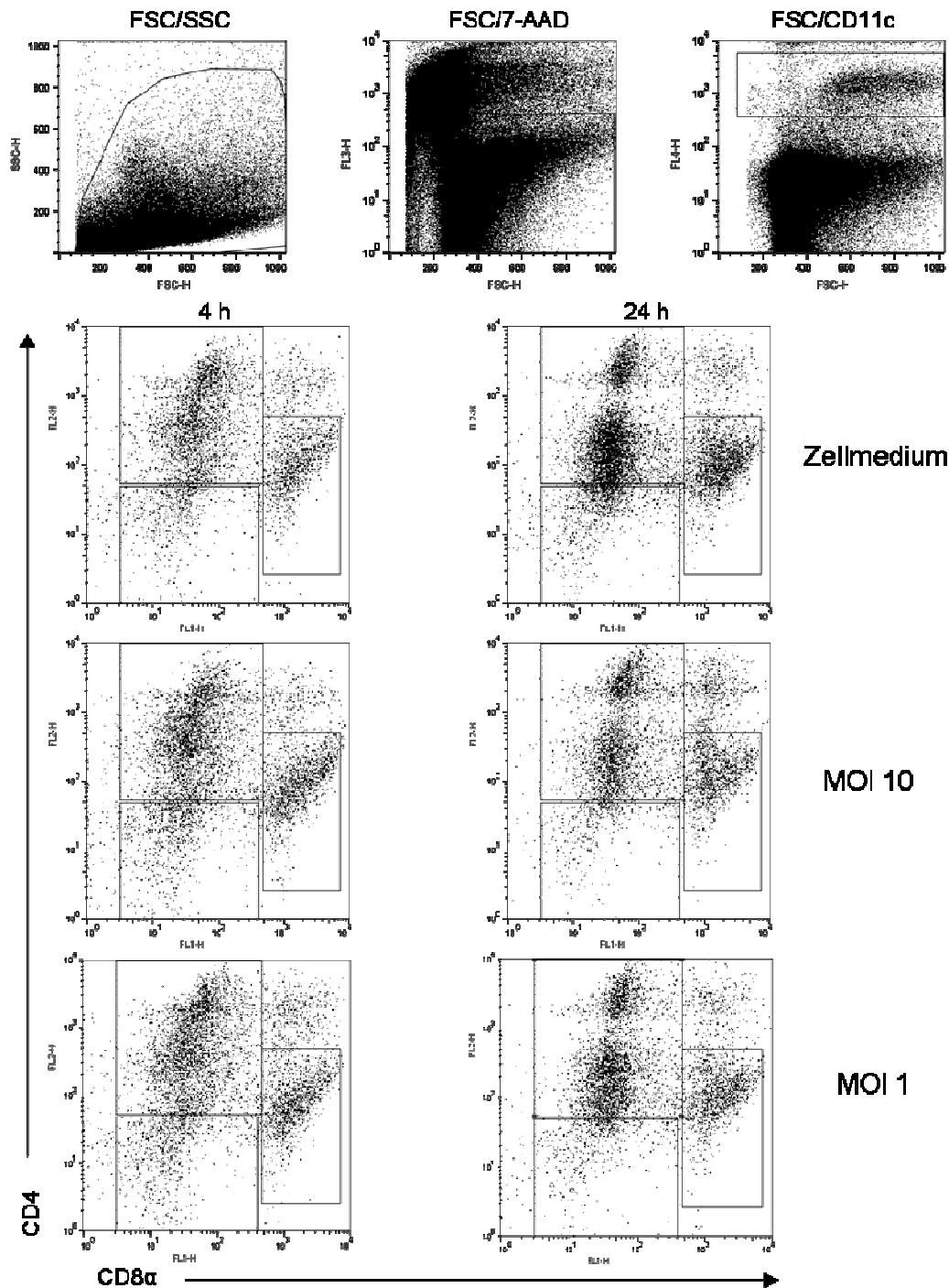


Abb. 32: FACS-Analyse der Interaktion von murinen Milzzellen und *Ye* *in vitro*

Milzzellen aus C57BL/6 Mäuse wurden mit *Ye* mit einer MOI 10 und 1 bzw. mit Medium inkubiert. Nach 4 und 24 Stunden wurde die Zellen gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8 α , die toten Zellen mittels 7-AAD ausgeschlossen und die Anzahl der DC-Subpopulationen durchflusszytometrisch ermittelt. Die Dotplots zeigen die Gating-Strategie zur Analyse der DC-Subpopulationen. Daten sind repräsentativ für zwei Experimente mit mindest. zwei Ansätze pro Bedingung.

4.1.8 Hitze-inaktivierte Ye besitzen keinen Effekt auf DCs *in vivo*

Um zu kontrollieren, ob der Verlust der DCs durch bakterielles LPS von Ye induziert wird, das ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien ist, wurden C57BL/6 Mäusen hitze-inaktivierte Yersinien (HKY) i.v. bzw. den Kontrollmäusen PBS i.v. injiziert. Für die Inaktivierung der Yersinien erfolgte ein Erhitzen der Bakterien für 4 h bei 60°C. Zur Kontrolle des Inaktivierungserfolges wurden die Infektionsdosen und die Bakterienzahl der Milzen durch Ausplattieren bestimmt. Die Auswertung der DCs in der Milz nach drei Tagen durch das Durchflusszytometer ergab, dass nur Infektionen mit lebenden Yersinien zur Verminderung der DCs führen (Abb. 33). Es konnte daher angenommen werden, dass für den DC-Verlust während der Infektion mit Ye *in vivo* ein vitaler Erreger benötigt wird.

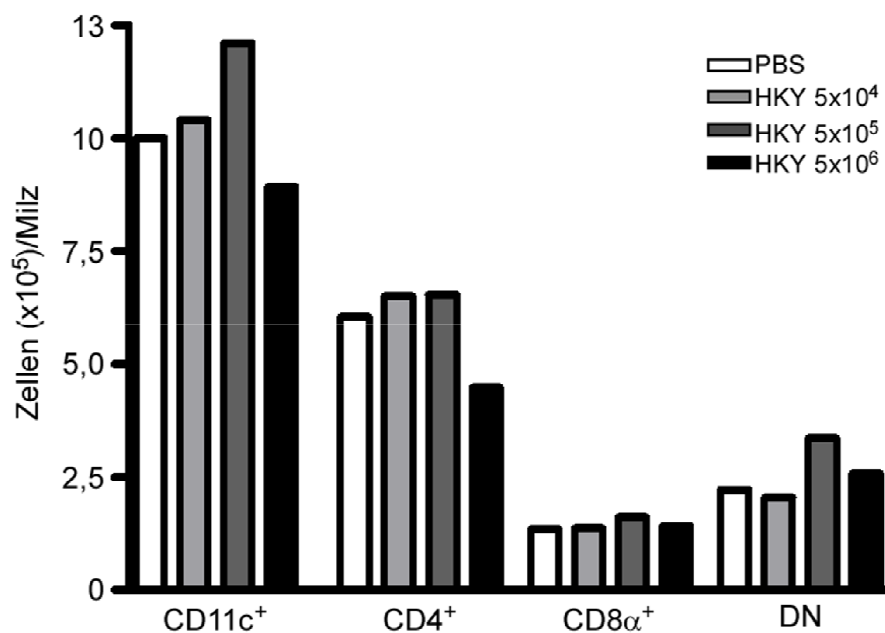


Abb. 33: Analyse der DCs in der Milz nach Injektion von hitze-inaktivierten Yersinien

C57BL/6 Mäuse wurde i.v. PBS (weiße Balken), 5 x 10⁴ HKY (hellgraue Balken), 5 x 10⁵ HKY (dunkelgraue Balken) oder 5 x 10⁶ HKY (schwarze Balken) injiziert. Nach drei Tagen wurden die CD11c⁺DCs bzw. die DC-Subpopulationen mittels FACS analysiert.

4.1.9 Turnover-Rate der DCs nach Infektion mit Ye *in vivo*

Der Einbau von BrdU (Bromodesoxyuridin) in die DNA während des Zellzykluses kann zur Analyse der Zellproliferation herangezogen werden. Das eingebaute BrdU

wird nach intrazellulärer Färbung durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen und mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Um zu untersuchen, ob die Infektion mit Ye einen Einfluss auf die Proliferation der DC-Subpopulationen hat, wurden C57BL/6 Mäuse zunächst mit Yersinien infiziert und erhielten täglich eine intravenöse BrdU-Injektion. Die Kontrolltiere, welche anstatt Ye eine PBS-Injektion bekommen haben, erhielten ebenfalls die BrdU-Behandlung (Abb. 39).

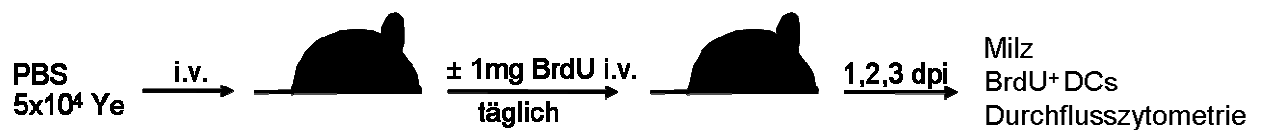


Abb. 34: Experimentelle Strategie zur Analyse der Proliferationsrate von DC Subpopulationen

C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^4 Ye i.v. infiziert bzw. den Kontrollmäusen wurde PBS appliziert. Anschließend erhielten die Mäuse täglich 1 mg BrdU i.v. verabreicht. Nach angegebenen Zeitpunkten wurden die BrdU⁺DC-Subpopulationen mittels Durchflusszytometer bestimmt.

Kamath et al. [163] konnte in Experimenten mit unbehandelten Mäusen zeigen, dass CD8 α ⁺ DCs einen vermehrten Einbau an BrdU als die beiden anderen Subpopulationen in der Milz aufweisen. Diese Ergebnisse konnten in PBS-behandelten Mäusen reproduziert werden (Abb. 35 und 36). Zwei und drei Tage nach Infektion mit Ye kam es zu einem signifikanten Anstieg der BrdU⁺DCs. Bei den CD8 α ⁺ DCs stieg der prozentuale Anteil von 25 % auf 30 % (2 dpi) und von 65 % auf 80 % (3 dpi). Einen ähnlichen Verlauf zeigte sich bei den DN DCs. Hier erhöhte sich der prozentuale Anteil an BrdU⁺ von 20 % auf 25 % (2 dpi) und von 40 % auf 70 %. Einen deutlich erhöhten Anteil an BrdU konnte jedoch bei den CD4⁺ DCs beobachtet werden. Etwa 10 % (2 dpi) bzw. 45 % mehr BrdU⁺CD4⁺ DCs konnte im Vergleich zu den Kontrollmäusen ermittelt werden (Abb. 35 und 36). Das bedeutet, dass eine Infektion mit Ye zu einer erhöhten Proliferationsrate in DCs führt.

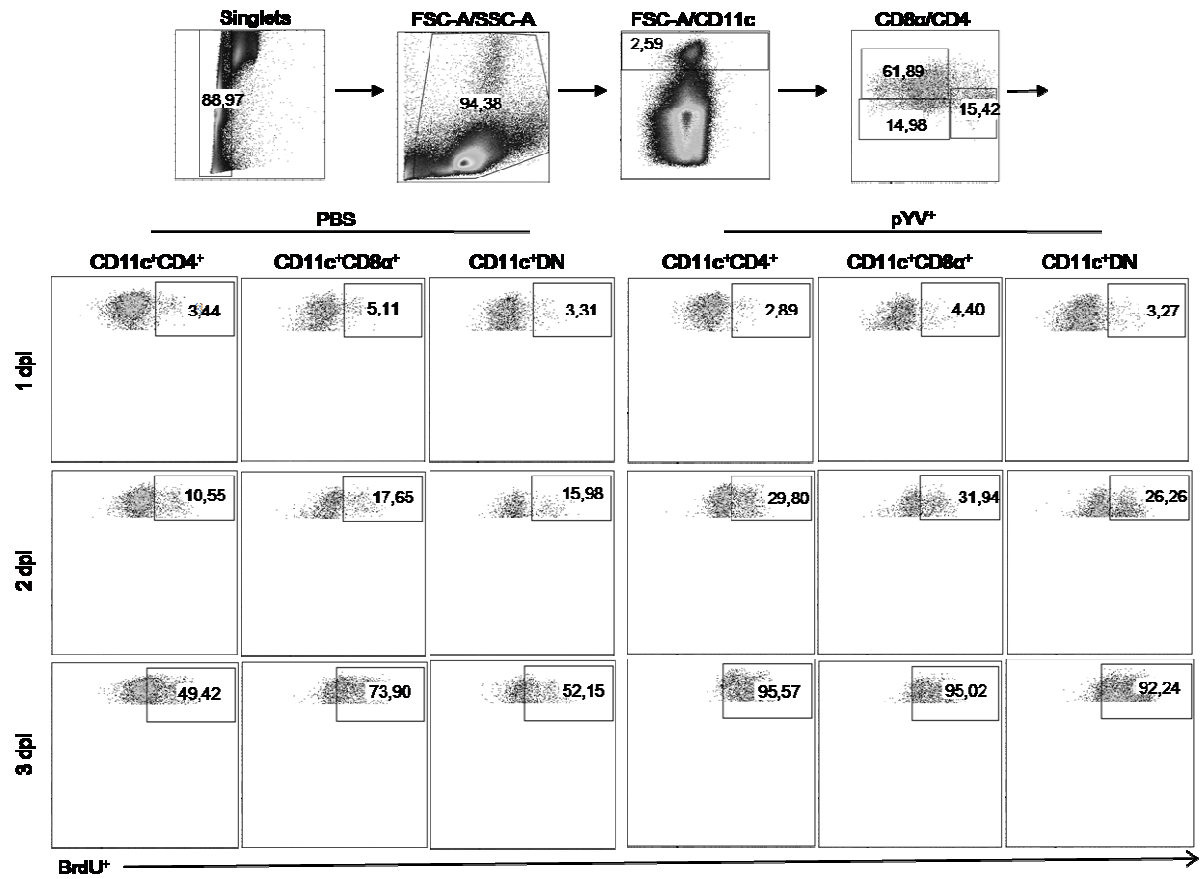


Abb. 35: Durchflusszytometrische Analyse der BrdU⁺DCs nach Infektion mit Ye
 C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^4 Ye i.v. infiziert bzw. den Kontrollmäusen wurde PBS injiziert und tägliche i.v. BrdU verabreicht. Die Abb. zeigt die Gating-Strategie und in Prozent die BrdU⁺DC-Subpopulationen nach 1 bis 3 dpi.

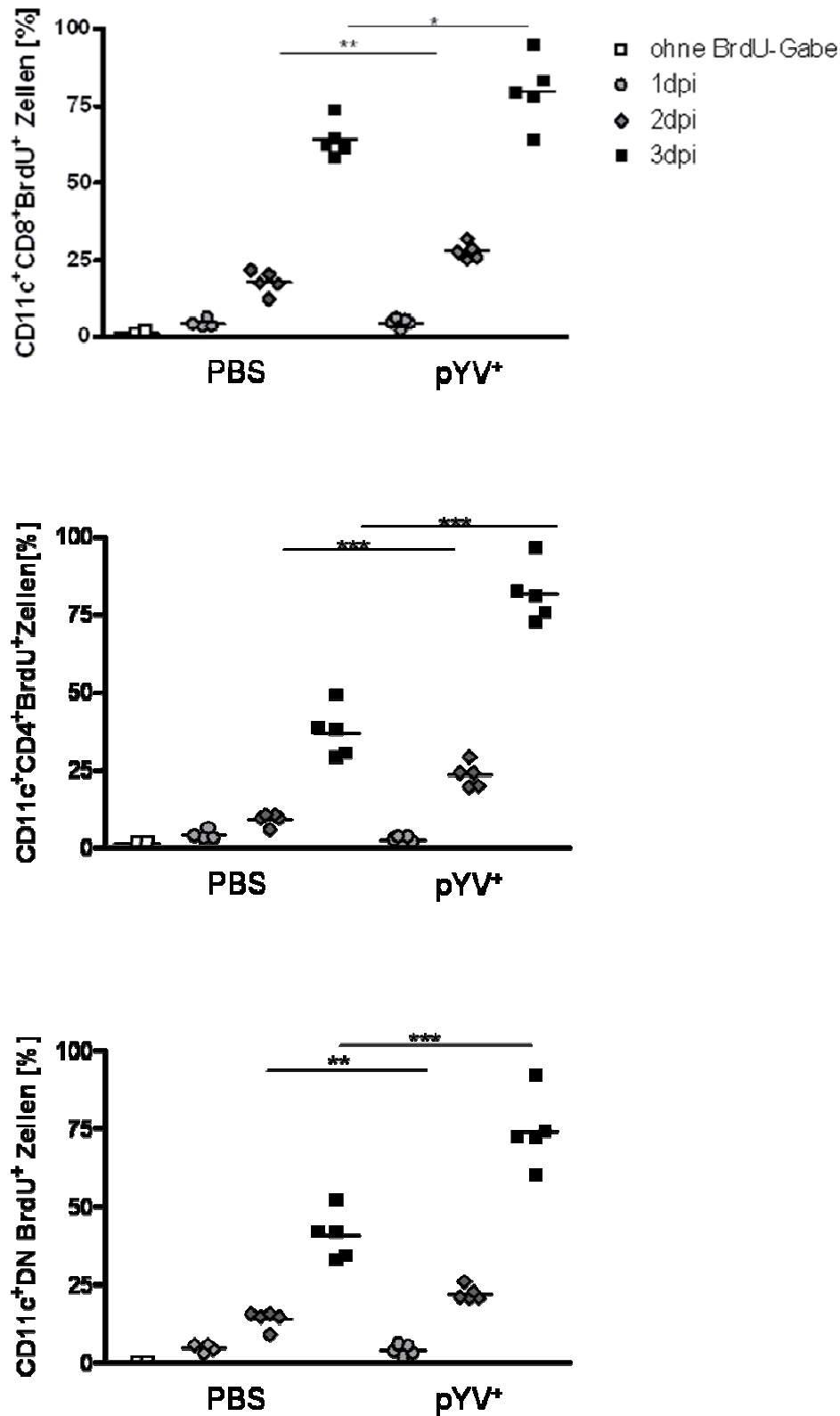


Abb. 36: Analyse der Proliferationsrate von DCs nach Infektion mit Ye

C57BL/6 Mäuse wurden mit Ye i.v. infiziert bzw. wurde PBS injiziert und täglich BrdU i.v. appliziert. Nach ein bis drei Tagen wurde die Milz entnommen, die Zellen mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8 α und BrdU gefärbt und diese durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von BrdU⁺DC-Subpopulationen. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

4.1.10 Rekrutierung von DC Subpopulationen in die Milz nach Infektion mit Ye

Um zu analysieren, welche der DC Subpopulationen durch eine Infektion mit Ye in ihrer Rekrutierung in die Milz gehemmt wird, wurden transgene Mäuse, die den Diphtherie-Toxinrezeptor unter der Kontrolle des CD11c Promotors exprimieren (CD11c.DOG Mäuse), verwendet. Dabei führt die intraperitoneale (i.p.) Applikation von Diphtherie-Toxin (DT) in diesen Mäusen zur Apoptose von DCs (ca. 90%). Die einmalige Gabe von DT hat keine toxische Wirkung auf die Maus. Ein Tag nach DT Gabe wurde den Mäusen PBS bzw. 5×10^4 Ye i.v. injiziert (Versuchsaufbau siehe Abb. 37).

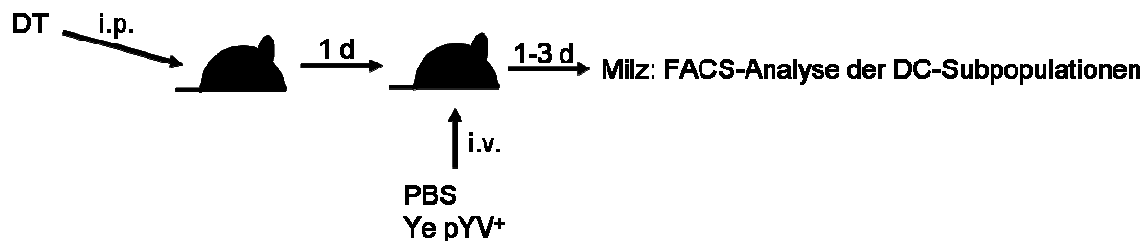


Abb. 37: Experimenteller Aufbau zur Analyse der DCs recovery in CD11cDOG Mäusen

Vier Tage nach DT Gabe waren alle DC Subpopulation in den Kontrollmäusen auf den Ausgangswert einer unbehandelten Maus ohne DT Behandlung zurückgekehrt. Die Yersinien-infizierten Mäuse zeigten ähnliche Zellzahlen an DN DCs, 50 % weniger $CD8\alpha^+$ DCs und keine Zunahme an $CD4^+$ DCs im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Abb. 38). Diese Daten zeigen, dass entweder die Rekrutierung oder die Ausreifung der $CD4^+$ und $CD8\alpha^+$ DCs in die Milz durch Ye beeinflusst wird.

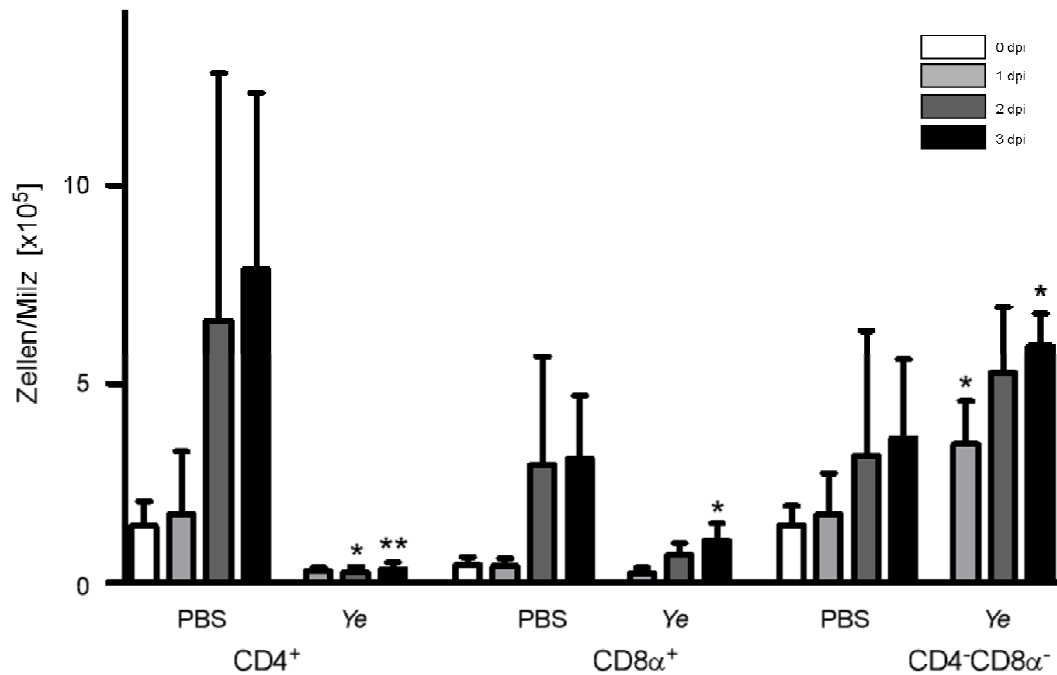


Abb. 38: Analyse der DC Subpopulationen in CD11cDOG Mäuse

CD11cDOG Mäuse wurde einmalige DT i.p. appliziert, um die DCs zu depletieren. Nach 24 h wurden den Mäusen PBS oder 5×10^4 Ye i.v. injiziert. Die absolute Zellzahl der DC-Subpopulationen wurde nach ein bis vier Tagen nach DT -Gabe mittels Durchflusszytometer bestimmt. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

4.1.11 Entwicklung der DCs aus ihren Vorläuferzellen nach Infektion mit Ye

DC-Subpopulationen entwickeln sich aus den Progenitorzellen MDPs („macrophages and DC precursor“), CDPs („common DC precursor“) und pre-cDCs. Um zu überprüfen, ob Ye die Rekrutierung der cDCs in die Milz beeinflusst, sollen diese Vorläuferzellen im Verlauf einer Infektion im Knochenmark (BM), Blut und Milz analysiert werden. Dafür wurden C57BL/6 und TRIF^{-/-} Mäuse mit Ye i.v. infiziert bzw. die Kontrollmäuse mit PBS behandelt. Ein bis drei Tage nach Infektion wurden die Vorläuferzellen im Knochenmark, Blut und Milz mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl im Femur zeigte in C57BL/6 und TRIF^{-/-} Mäusen eine Abnahme (Abb. 40) im Verlauf der Infektion mit Ye, die mit der Zunahme an Bakterien im Femur korrelierte (Abb. 39).

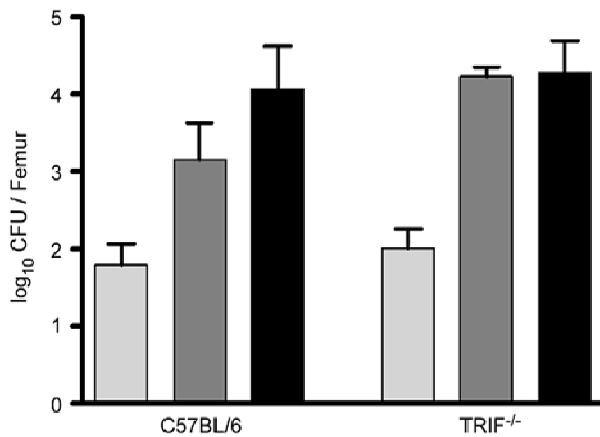


Abb. 39: Bakterienmenge im Femur im Verlauf der Infektion mit Ye

C57BL/6 und TRIF^{-/-} Mäuse wurden mit Ye i.v. infiziert und nach ein bis drei Tagen getötet, Femur entnommen, Knochenmark ausgespült und auf MH-Platten ausplattiert um die Keimzahl zu ermitteln. Dargestellt ist die Keimzahl nach 1 dpi (hellgrau), 2 dpi (dunkelgrau) und 3 dpi (schwarz). Daten sind repräsentativ für drei Experimente mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe.

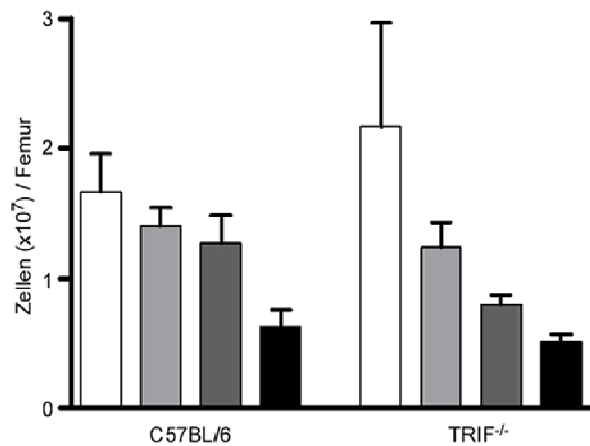


Abb. 40: Gesamtzellanzahl im Femur im Verlauf der Infektion mit Ye

C57BL/6 und TRIF^{-/-} Mäuse wurden mit Ye i.v. infiziert und ein bis drei Tage nach Infektionsbeginn getötet, Milz entnommen, homogenisiert und die Zellzahl bestimmt. Weiße Balken: PBS-behandelt; hellgraue Balken: 1 dpi, dunkelgraue Balken: 2 dpi, schwarze Balken: 3 dpi. Daten sind repräsentativ für drei Experimente mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe.

MDPs/CDPs können aufgrund der Expression ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle identifiziert werden. Sie sind lin⁻ (CD3⁻, CD19⁻, Ter119⁻, NK1.1⁻, B220⁻, CD11c⁻, CD11b⁻), CD135⁺ und CD115⁺. Abb. 46 zeigt exemplarisch die Gating-Strategie für diese Vorläuferzellen aus Knochenmarkzellen einer Maus. Im Vergleich zu den Kontrollmäusen reduzieren sich der prozentuale Anteil und die absolute Zellzahl an MDPs/CDPs in Yersinien-infizierten Mäusen um mehr als die Hälfte (Abb. 47). Weiterhin ist zwischen den PBS-behandelten C57BL/6 und TRIF^{-/-} Mäusen ein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil an MDPs/CDPs zu beobachten. Die MDPs/CDPs machen einen Anteil von ca. 15 % an Knochenmarkzellen in den C57BL/6-Mäuse aus, im Gegensatz dazu liegt dieser Anteil bei den TRIF^{-/-}-Mäuse bei ca. 7,5 %.

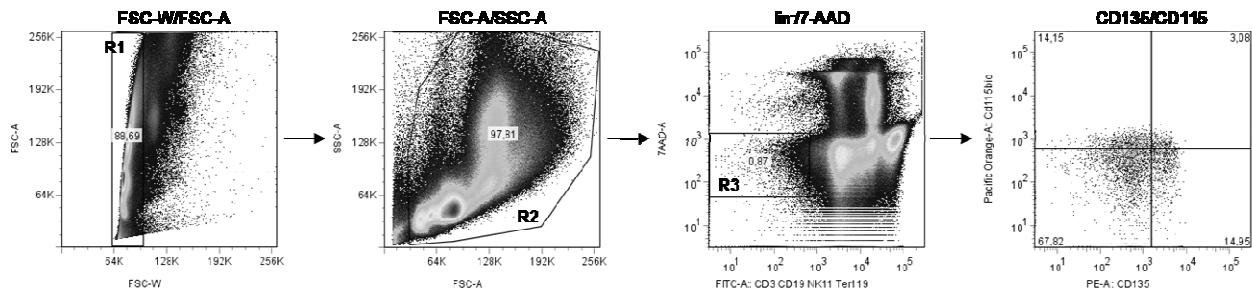


Abb. 41: Durchflusszytometrische Charakterisierung der MDPs/CDPs im Knochenmark
 Dargestellt ist eine exemplarische Färbung von MDPs/CDPs aus Knochenmarkszellen einer C57BL/6 Maus. Aus den Leukozyten (R2) wurden die lebenden lin⁻-Zellen (R3) bestimmt, aus denen dann wiederum die CD135⁺ und CD115⁺ Zellen ermittelt wurden. Als linienspezifische Marker wurden folgende Antikörper verwendet: CD3, CD19, Ter119, NK1.1, B220, CD11c, CD11b.

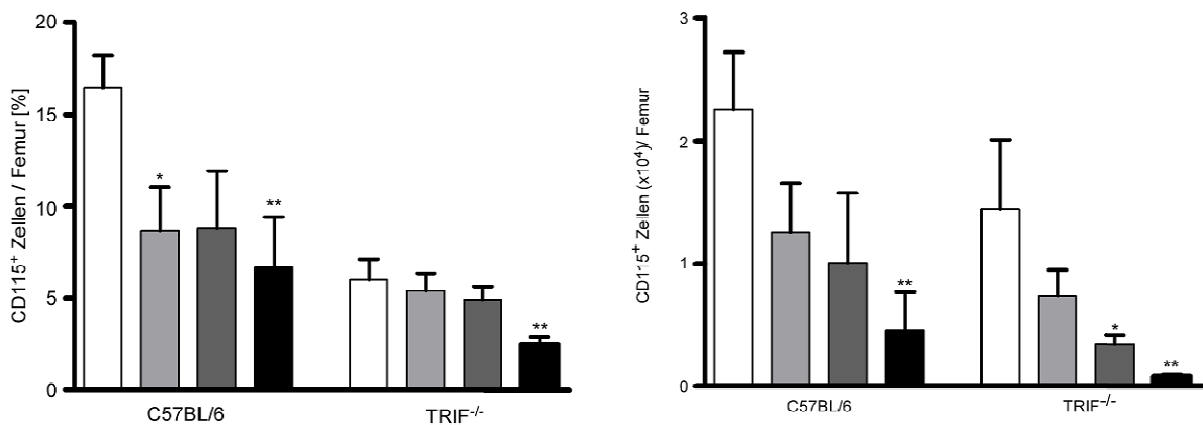


Abb. 42: Analyse der MDPs/CDPs im Knochenmark im Verlauf der Infektion mit Ye
 C57BL/6 und TRIF^{-/-} Mäuse wurden mit Ye i.v. infiziert bzw. wurde PBS injiziert. Nach ein bis drei Tage wurde ein Femur entnommen, gefärbt mit Antikörpern gegen CD3, CD19, Ter119, NK1.1, B220, CD11c, CD11b, (um die lin⁺-Zellen auszuschließen), CD135 und CD115. Die lebenden MDPs/CDPs wurden durchflusszytometrisch ermittelt. Die Diagramme geben die MDPs/CDPs in Prozent (links) und absoluter Zellzahl (rechts) an. Weiße Balken: PBS; hellgraue Balken: 1 dpi; dunkelgraue Balken: 2 dpi; schwarze Balken: 3 dpi. Daten sind repräsentativ für drei Experimente mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede bezogen auf die Daten der jeweiligen PBS-behandelten Kontrollmäuse.

Durch die abnehmende Anzahl an MDPs/CDPs im Knochenmark im Verlauf der Infektion mit Ye könnte vermutet werden, dass diese Zellen sich zu den pre-cDCs differenzieren, um den Nachschub an benötigten DCs während der Infektion zu gewährleisten. Daher wurden die pre-cDCs in der Milz und im Blut nach Infektion mit

Ye analysiert. Analog zu den MDPs/CDPs besitzen die pre-cDCs charakteristische Oberflächenmoleküle durch die sie eindeutig identifizierbar sind, d.h. sie sind lin⁻ (CD3⁻, CD19⁻, Ter119⁻, NK1.1⁻), CD11⁺, CD43⁺ und CD172^{inter}. Um die pre-cDCs in der Milz und im Blut zu ermitteln, wurden sie mit Antikörpern gegen CD3, CD19, Ter119, NK1.1, CD11c, CD45RA, CD43 und CD172 (= Sirpα) gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer detektiert. In Abb. 48 ist die Gating-Strategie für die Analyse der pre-cDCs in der Milz und im Blut anhand eines exemplarischen Beispiels an Milzzellen einer PBS-behandelten Maus dargestellt.

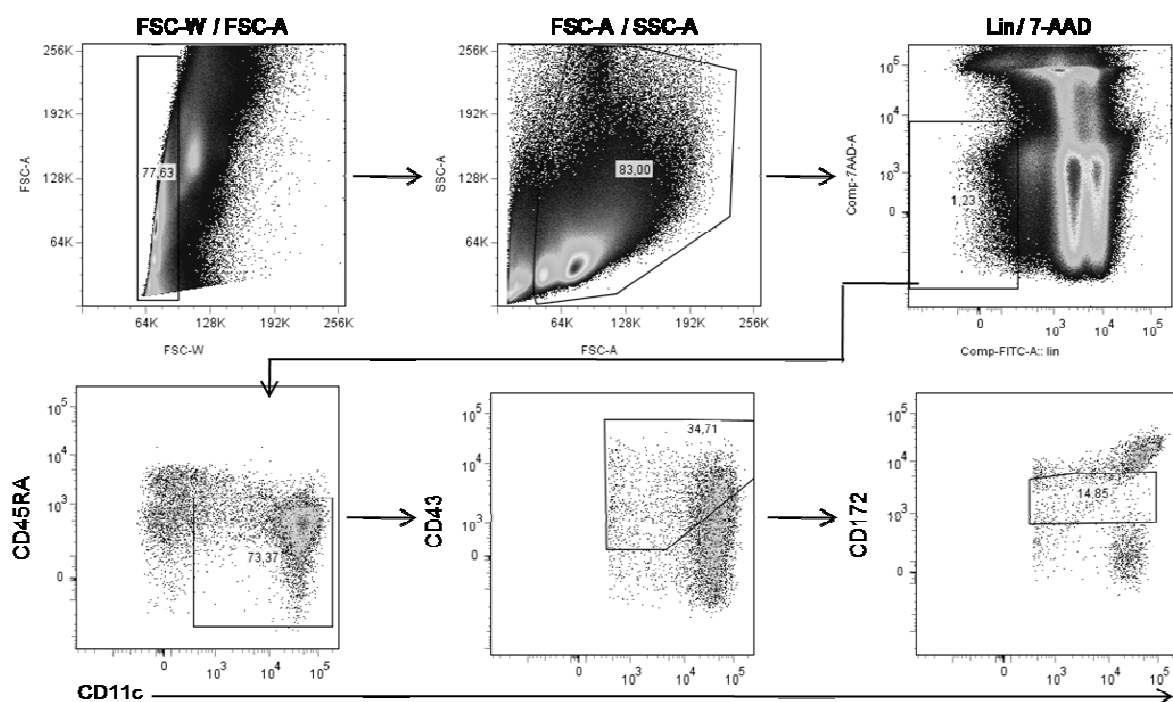


Abb. 43: Durchflusszytometrische Charakterisierung der pre-cDCs in der Milz

Dargestellt ist eine exemplarische Färbung von pre-cDCs von Milzzellen einer C57BL/6-Maus.

In Yersinien-infizierten Mäusen konnte im Vergleich zu den Kontrollmäusen ein erhöhter prozentualer Anteil an pre-cDCs in der Milz - sowohl in den C57BL/6 als auch in den TRIF^{-/-} Mäusen - gezeigt werden (Abb. 44 links). Der prozentuale Anteil in den Kontrollmäusen beträgt 15 %, 24 h nach Infektion bei ca. 30 %, 48 h und 72 h nach Infektion bei ca. 40 %. In der Zellzahl konnte eine signifikante Zunahme der pre-cDCs von C57BL/6 Mäusen im Verlauf der Infektion mit Ye beobachtet werden. Im Kontrast dazu konnten keine deutlichen Unterschiede der Zellzahl an pre-cDCs in

den mit Ye-infizierten TRIF^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ihren Kontrollmäusen beobachtet werden. Der einzige signifikante Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen konnte in der absoluten Anzahl festgestellt werden. In den C57BL/6 Mäuse kommen in der Milz weniger pre-DCs vor im Vergleich zu den TRIF^{-/-} Mäusen vor. Eine weitere Differenz zeigte sich zwei Tage nach Infektion. Zu diesem Zeitpunkt steigt die Anzahl der pre-cDCs um das 10-fache in der Milz der C57BL/6-Mäusen an, bleibt aber bei den TRIF^{-/-}-Mäusen auf dem Wert der Kontrollmäuse.

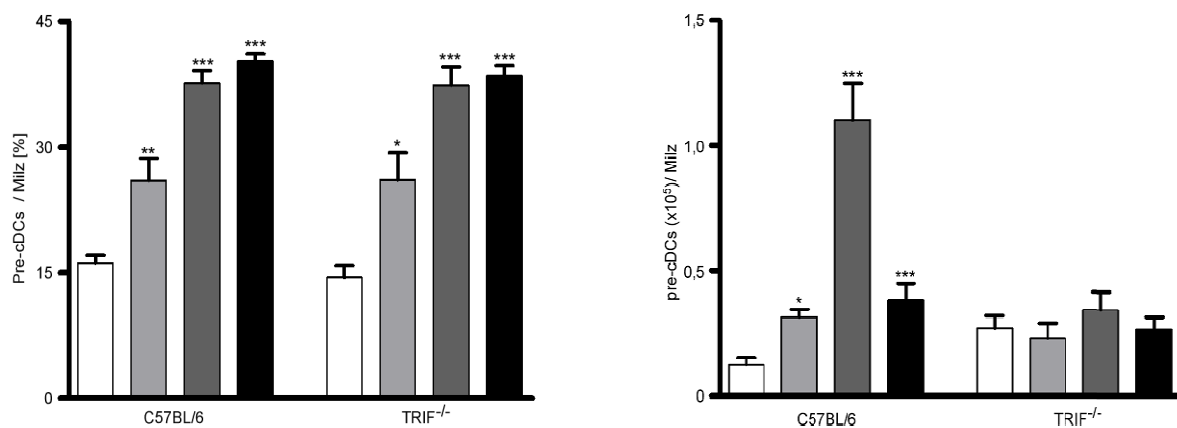


Abb. 44: Analyse der pre-cDCs in der Milz im Verlauf der Infektion mit Ye

C57BL/6 und TRIF^{-/-} Mäuse wurden mit Ye i.v. infiziert bzw. wurde PBS injiziert. Nach ein bis drei Tage wurde die Milz entnommen, gefärbt mit Antikörpern gegen CD3, CD19, Ter119, NK1.1 (um die lin⁺Zellen auszuschließen), CD11c, CD45RA, CD43 und CD172. Die lebenden pre-cDCs wurden durchflusszytometrisch ermittelt. Die Diagramme geben die pre-cDCs in Prozent (links) und absoluter Zellzahl (rechts) an. Weiße Balken: PBS; hellgraue Balken: 1 dpi; dunkelgraue Balken: 2 dpi schwarze Balken: 3 dpi. Daten sind repräsentativ für drei Experimente mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede bezogen auf die Daten der jeweiligen PBS-behandelten Kontrollmäuse.

Ausgehend von den Ergebnissen der Analyse der DC-Vorläuferzellen in Knochenmark und Milz stellte sich die Frage, ob die pre-cDCs sich im Blut anhäufen und nicht in die Milz migrieren. Daher wurden die pre-cDCs im Blut analysiert. Die Farbe- und Gating-Strategie zur Analyse im Durchflusszytometer war dieselbe wie die in der Milz. Der Vergleich des prozentualen Anteils der pre-cDCs im Blut zwischen PBS-behandelten und mit Ye-infizierten Mäusen ergab keinen Unterschied (Abb. 45, links). Wohingegen die Berechnung der absoluten Zellzahl an pre-cDCs im

Blut eine ausgeprägte Abnahme bei den infizierten Mäusen (1dpi $\sim 0,5 \times 10^4$, 2 und 3dpi $\sim 1 \times 10^4$) im Vergleich zu den Kontrollmäusen ($\sim 5,5 \times 10^4$) (Abb. 45, rechts) zeigt.

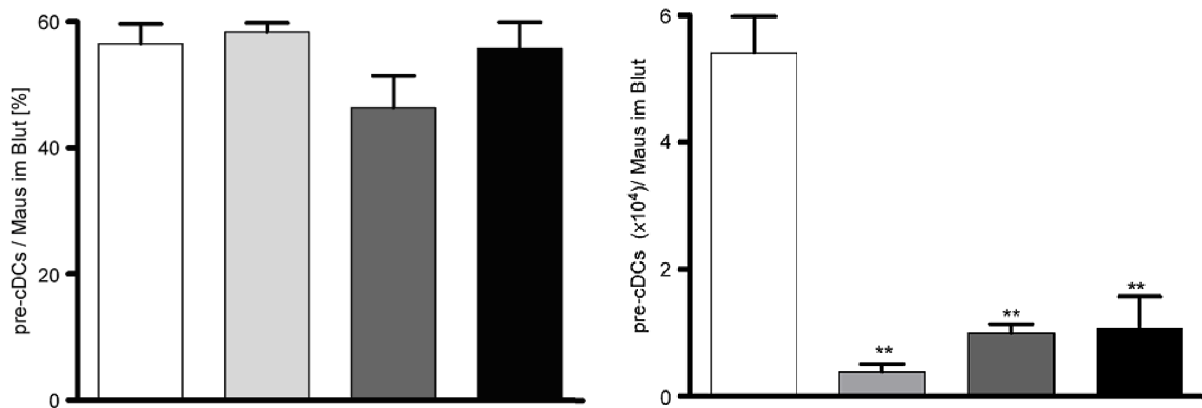


Abb. 45: Analyse der pre-cDCs im Blut im Verlauf der Infektion mit Ye

C57BL/6 Mäuse wurden mit Ye i.v. infiziert bzw. wurde PBS injiziert. Nach ein bis drei Tage wurde die Milz entnommen, gefärbt mit Antikörpern gegen CD3, CD19, Ter119, NK1.1, (um die lin^+ Zellen auszuschließen), CD11c, CD45RA, CD43 und CD172. Die lebenden pre-cDCs wurden durchflusszytometrisch ermittelt. Die Diagramme geben die pre-cDCs in Prozent (links) und absoluter Zellzahl (rechts) an. Weiße Balken: PBS; hellgraue Balken: 1 dpi; dunkelgraue Balken: 2 dpi schwarze Balken: 3 dpi. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede bezogen auf die Daten der PBS-behandelten Kontrollmäuse.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die MDPs/CDPs im Knochenmark nach einer Infektion mit Ye sowohl in den C57BL/6 als auch bei den TRIF^{-/-} Mäusen abnehmen. Eine Anhäufung der pre-cDCs im Blut kann ausgeschlossen werden, da diese sich prozentual nicht verändern und die Anzahl der pre-cDCs 24 h nach Infektion deutlich vermindert sind. In der Milz steigen die pre-cDCs prozentual in beiden Maustämmen signifikant an. Wohingegen die Anzahl der pre-cDCs nur bei den C57BL/6 Mäusen ansteigt. Daraus kann man schließen, dass bei einer Infektion mit Ye die Entwicklung der DC-Vorläuferzellen beeinträchtigt wird. Interessanterweise deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die Differenzierung der pre-cDCs zu cDCs in der Milz gehemmt wird, da die pre-cDCs in C57BL/6 Mäusen leicht zunehmen, jedoch eine Abnahme an cDCs im Verlauf der Infektion beobachten. Diese Abnahme der cDCs wurde bei TRIF^{-/-} Mäusen nicht gesehen (Abb.26), obwohl keine Zunahme der Vorläuferzellen in der Milz ermittelt wurde.

4.1.12 Produktion von Flt3-Ligand nach Infektion mit Ye

Flt3 (CD135) ist ein wichtiger Membranrezeptor von DCs [164], der essentiell für die Regulation der DC-Homöostase in der Milz im steady-state ist. Durch die Bindung von Flt3 mit Flt3-Ligand (FLT3L = fms-like tyrosine-kinase 3 ligand) wird die Anzahl der DCs durch die Regulation ihrer Zellteilungen in der Peripherie kontrolliert [18,165]. Zusätzliche Flt3L Applikation bei Mäusen führt zu einer signifikanten Zunahme an DCs im Blut, in der Milz in den Lymphknoten und in der Lunge [166]. Die Fragestellung dieses Experiments war, ob die Produktion an Flt3L durch die Infektion mit Ye beeinflusst wird. Daher wurde die Menge an Flt3L im Serum nach ein bis drei Tage nach Infektion mittels ELISA bestimmt. Da die Infektion mit Ye von TRIF^{-/-} Mäusen keinen Verlust der DCs aufweist, könnte es naheliegen, dass es in diesen Mäusen entweder eine höhere Ausschüttung von Flt3L gibt oder die Ausschüttung nicht durch die Yersinien beeinflussen wird. Es gab signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Yersinien-infizierten Mäusen. Die Menge an Flt3L erhöhte sich von 1000 pg/ml in Kontrollmäusen auf 3500 pg/ml 1 Tag, 3000 pg/ml zwei Tage und 2000 pg/ml drei Tage nach Infektion mit Ye. Bei den TRIF^{-/-} Mäusen sieht man zwar einen Anstieg, der jedoch nie höher ist als bei den Wildtyp-Mäusen (Abb. 44). Das bedeutet, dass die Menge von Flt3L keine entscheidende Rolle auf den DC-Verlust während der Infektion mit Ye besitzt. Vor allem verfügen die TRIF^{-/-} Mäuse nicht über mehr Flt3L in ihrem Serum trotz der konstanten DC-Anzahl im Verlauf der Infektion mit Ye.

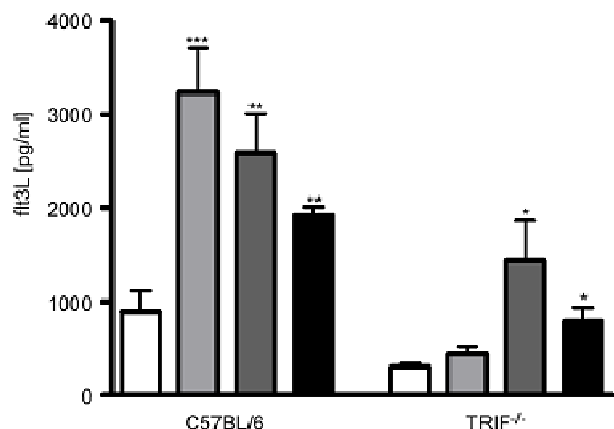


Abb. 46: Bestimmung von Flt3L im murinem Serum.

Mittels ELISA wurden die Mengen von Flt3L des Serum in C57BL/6 und TRIF^{-/-} Mäuse analysiert (weißer Balken: PBS i.v. appliziert; hellgraue Balken: 1 dpi, dunkelgraue Balken: 2 dpi, schwarze Balken: 3 dpi). Daten sind repräsentativ für zwei Experimente mit mindest. 5 Mäusen pro Gruppe.* präsentieren statistisch signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen.

4.2 Die Rolle von YopP auf die Funktion der DCs *in vivo*

4.2.1 Einfluss von YopP auf die T-Zell-Proliferation

Nachdem im Projekt ein deutlicher Einfluss von *Yersinia enterocolitica* auf die T-Zell-Aktivierung beobachtet wurde (Kapitel 4.1.1), stellt sich die Frage, ob YopP eine Rolle in der T-Zellaktivierung spielt. Dafür wurden C57BL/6 Mäuse mit 5×10^4 Ye pYV⁺ (Wildtypstamm) und mit der YopP-defizienten Mutante pYV⁺ΔyopP i.v. infiziert. Nach vier Stunden wurden 2×10^6 CFSE-markierte CD4⁺-T-Zellen aus OVA-transgenen OT-II Mäuse adoptiv transferiert. Ein Tag nach Infektion erfolgte die Antigengabe von Ovalbumin (OVA₃₂₃₋₃₃₉) durch i.v. Injektion. Die Analyse der T-Zell-Proliferation erfolgte 3 Tage nach Infektion mittels Durchflusszytometrie (experimentelles Schema siehe Abb. 9). Die Gating-Strategie ist in Abb. 10 anhand einer PBS-behandelten Maus dargestellt. Die Analyse der CFSE-Verteilung zeigte eine um 20 % erhöhte „responder frequency“ [159,160] bei pYV⁺ΔyopP-infizierten Mäusen im Vergleich zu den pYV⁺-infizierten Mäusen (Abb. 47). Das deutet daraufhin, dass YopP die T-Zellaktivierung hemmt, indem die DCs in Ihrer Funktion beeinflusst werden.

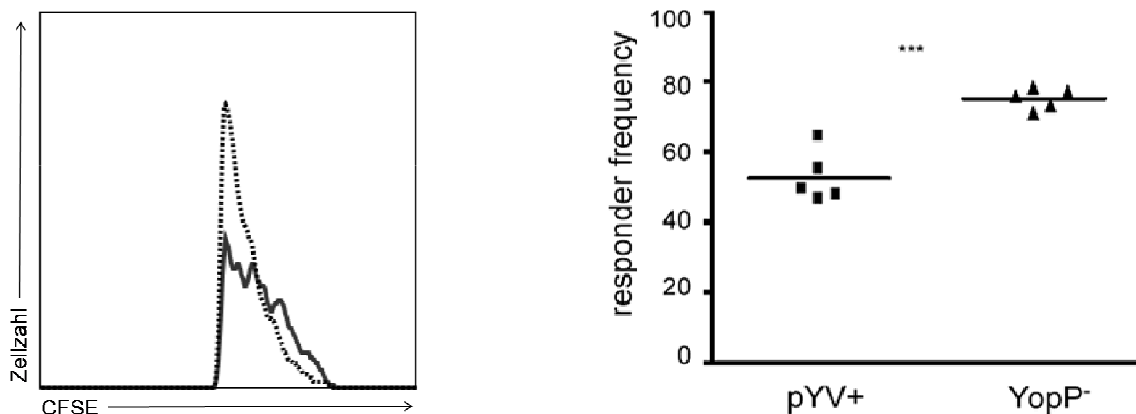


Abb. 47: T-Zellproliferation nach Infektion mit Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ΔyopP *in vivo*

CFSE-markierte T-Lymphozyten einer OT-II transgenen Maus wurden in Ye pYV⁺- und Ye pYV⁺ΔyopP-infizierte C57BL/6 Mäuse adoptiv transferiert. Ein Tag nach Infektion wurde OVA-Protein i.v. appliziert und die Proliferation der CD4⁺-T-Zellen nach drei Tagen anhand der CFSE-Verteilung bestimmt. Das Histogramm (links) zeigt die CFSE-Verteilung bei Ye pYV⁺ (schwarze Linie) und Ye pYV⁺ΔyopP-infizierte (gepunktete Linie) C57BL/6-Mäuse. Das Diagramm (rechts) zeigt die „responder frequency“ von CD4⁺-T-Zellen von Ye pYV⁺ (Quadrate) und Ye pYV⁺ΔyopP (Dreiecke) -infizierte C57BL/6 Mäuse. Daten sind exemplarisch aus einem von drei Experimenten mit je 5 Mäusen pro Gruppe dargestellt. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede.

4.2.2 YopP hemmt die Antigenaufnahme von CD8 α ⁺DCs

Durch *in vitro* Experimente wurde gezeigt, dass YopP die Clathrin-vermittelte Endozytose durch die Inhibition von MAPKs von DC hemmt [167,168]. Um zu analysieren, ob YopP ebenfalls an der reduzierten Antigenaufnahme von CD8 α ⁺DCs *in vivo* beteiligt ist, wurden C57BL/6 Mäuse mit 5×10^4 Ye pYV⁺ bzw. mit der Ye YopP-defizienten Mutante pYV⁺ Δ yopP i.v. infiziert. Ein bzw. drei Tage nach Infektion, wurde OVA-Alexa647 und OVA-DQ iv appliziert. Eine Stunde später wurde die Milz entnommen und die DCs im Durchflusszytometer analysiert (experimentelles Schema siehe Abb. 20). In Abb. 48 ist eine exemplarische Färbung der Antigenaufnahme und -Prozessierung dargestellt. Es zeigte sich kein Unterschied in der Antigenaufnahme der DC-Subpopulationen zwischen den mit Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ Δ yopP infizierten Mäusen 24 h nach Infektion (Abb. 48 und Abb. 49). Ebenfalls konnte keine Differenz in der Antigenaufnahme in CD4⁺DCs und DN DCs drei Tage nach Infektion beobachtet werden, wobei die Antigenaufnahme der CD8 α ⁺DCs von Ye pYV⁺ Δ yopP-infizierten Mäusen (~ 30 %) zu diesem Zeitpunkt signifikant höher war als die von Ye pYV⁺ (~ 16 %). Um zu untersuchen, ob die Antigenprozessierung ebenfalls durch YopP beeinträchtigt wird, wurde den Mäusen zusätzlich OVA-DQ i.v. injiziert (Abb. 20) und die OVA-DQ⁺-DC-Subpopulationen im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 48). Es konnten keine Unterschiede in der Antigenprozessierung der DC-Subpopulationen in den mit Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ Δ yopP infizierten Mäusen festgestellt werden (Abb. 50). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass YopP die Antigenaufnahme von CD8 α ⁺DCs hemmt. Die Beeinträchtigung in der Antigenaufnahme hat jedoch keinen Effekt auf die Antigenprozessierung.

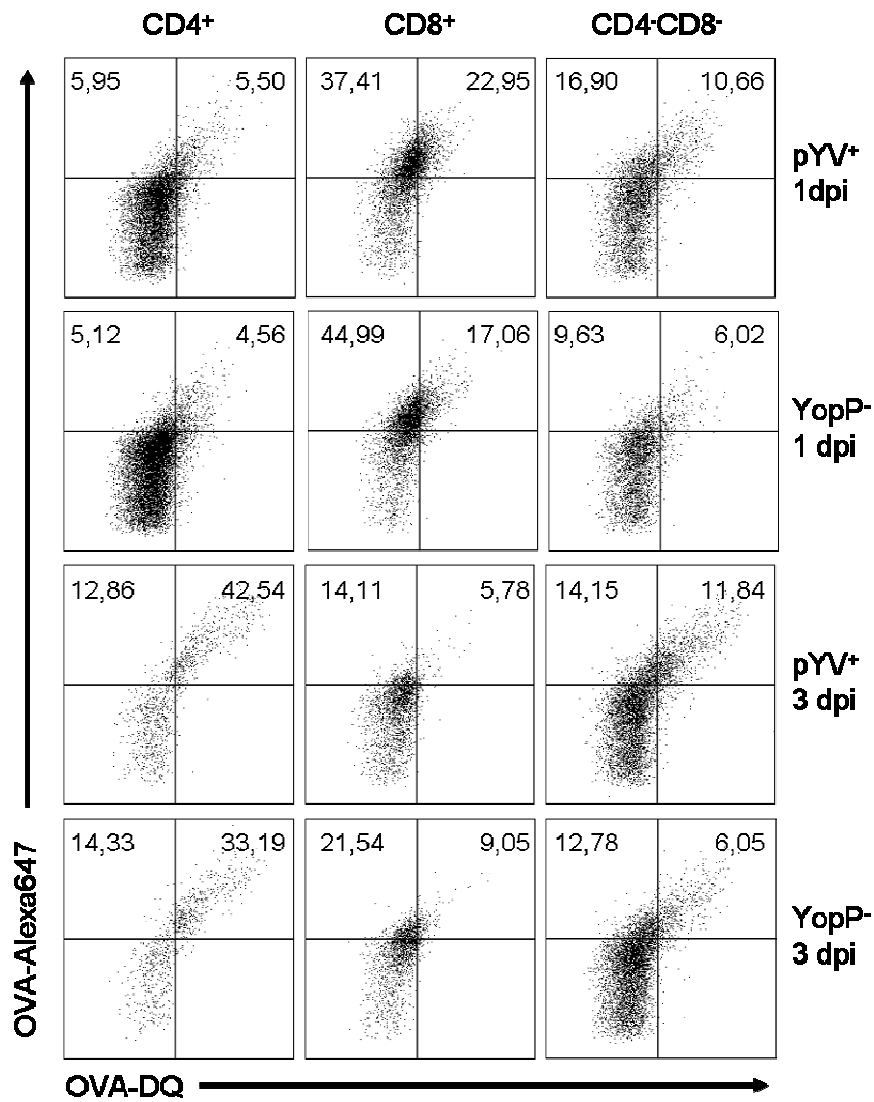


Abb. 48: FACS-Analyse der Antigenaufnahme u. -prozessierung nach Infektion mit Ye YopP- defiziente Mutante *in vivo*

Die Dot plots zeigen AlexaFluor647⁺ und DQ-OVA⁺ DC Subpopulationen von Ye pYV⁺- und Ye pYV⁺ΔyopP (YopP⁻) infizierten C57BL/6 Mäusen (1 dpi und 3 dpi).

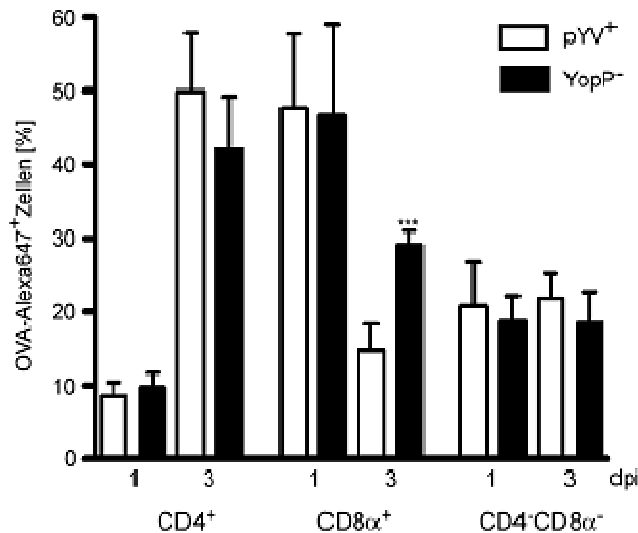


Abb. 49: Antigenaufnahme der DC-Subpopulationen nach Infektion mit Ye pYV⁺ΔyopP *in vivo*

Die Graphik zeigt AlexaFluor647⁺DC Subpopulationen von Ye pYV⁺ (weiße Balken) und Ye pYV⁺ΔyopP (yopP⁻) infizierten (schwarze Balken) C57BL/6 Mäusen nach 1 und 3 dpi. Daten sind repräsentativ für zwei Experimente mit 5 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ΔyopP.

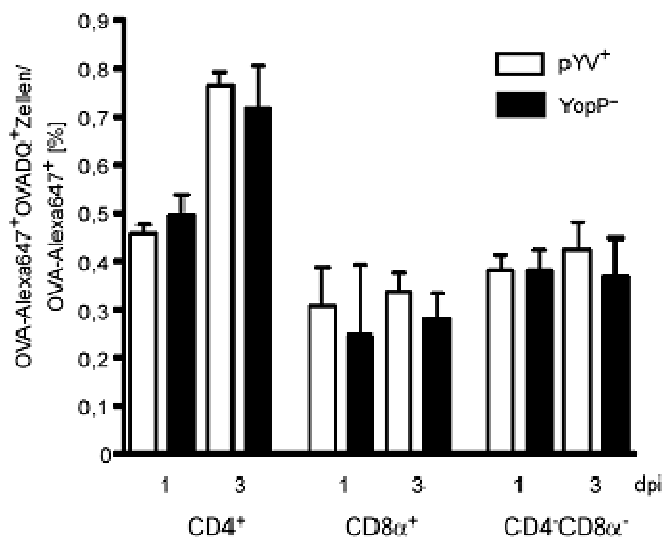


Abb. 50: Antigenprozessierung der DC-Subpopulationen nach Infektion mit Ye pYV⁺ΔyopP *in vivo*

Die Graphik zeigt den prozentualen Anteil an AlexaFluor647⁺DQTM-OVA⁺ Zellen bezogen auf alle AlexaFluor647⁺Zellen von Ye pYV⁺ (weiße Balken) und Ye pYV⁺ΔyopP (schwarze Balken) infizierten C57BL/6 Mäuse nach 1 und 3 dpi. Daten sind repräsentativ für zwei Experimente mit 5 Mäusen pro Gruppe

4.2.3 YopP induziert die Maturation und Produktion der Zytokine im frühen Verlauf der Infektion

Eine weitere Erklärung für die reduzierte T-Zell-Proliferation könnte die Beeinflussung der Maturation und der Zytokinproduktion der DCs durch Ye sein. Erfurth et al. [136] konnten in *in vitro* Experimente nachweisen, dass YopP die DC-Maturation hemmt und die Ausschüttung von IL-12 und TNF- α unterdrückt. Um den YopP-Effekt auf die Maturation und Zytokinsekretion *in vivo* zu ermitteln, wurden C57BL/6 Mäuse mit mit 5×10^4 Ye pYV⁺ bzw. mit der Ye YopP-defizienten Mutante pYV⁺ Δ yopP i.v. infiziert. Ein bzw. drei Tage nach Infektion erfolgte die Analyse der Maturation und der Zytokinsekretion der DC-Subpopulationen mittels Durchflusszytometer. Bei der Infektion der Mäuse mit der Mutante konnten keine Unterschiede in der Expression von MHC Klasse II- Molekülen in den DC-Subpopulationen ein bzw. drei Tage nach Infektion festgestellt werden außer bei den DN DCs 24 h nach Infektion im Vergleich mit den DC-Subpopulationen von Ye pYV⁺ infizierten Mäusen (Abb. 51). 24 Stunden nach Infektion war die Expression von MHC Klasse-II Molekülen auf DN DCs von pYV⁺ Δ yopP infizierten Mäusen signifikant geringer. Die Expression von CD80 und CD86 war 24 h nach Infektion ebenfalls auf allen drei DC-Subpopulationen von Ye pYV⁺ Δ yopP-infizierten Mäusen signifikant geringer im Gegensatz zu den Ye pYV⁺-infizierten Mäusen. Drei Tage nach Infektion konnte beobachtet werden, dass die Expression von CD80 in Ye pYV⁺ Δ yopP-infizierten Mäusen auf den Level der Ye pYV⁺-infizierten Mäusen vergleichbar war (auf CD4⁺DCs und DN DCs) bzw. auf CD8 α ⁺DCs signifikant höher war (Abb. 52). Ein ähnliches Ergebnis konnte in der Expression von CD86 drei Tage nach Infektion gefunden werden, wobei neben den CD8 α ⁺DCs auch die DN DCs von Ye pYV⁺ Δ yopP-infizierten Mäusen eine beträchtlichere Expression zeigten. Die Analyse der Zytokinproduktion (IL-12, IL-6 und TNF- α) zeigte signifikante Unterschiede zwischen dem Ye Wildtyp-Stamm und der YopP-Mutante ein bzw. drei Tage nach Infektion (Abb. 53, Daten von IL6- und IL-12 nicht gezeigt). Die Produktion von TNF- α durch CD4⁺DCs war sowohl 24 h als auch 72 h nach Infektion in Ye pYV⁺ Δ yopP-infizierten Mäusen signifikant geringer als in Ye pYV⁺-infizierte Mäuse. Bei den CD8 α ⁺DCs und DN DCs konnte ebenfalls eine signifikante schwächere Produktion an TNF- α in Ye pYV⁺ Δ yopP-infizierten Mäusen im Vergleich mit den Ye pYV⁺-infizierte Mäuse, jedoch erst drei Tage nach Infektion, beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass YopP im frühen Verlauf

der Infektion mit Ye die Maturation und die Produktion der Zytokine von Milz-DCs induziert.

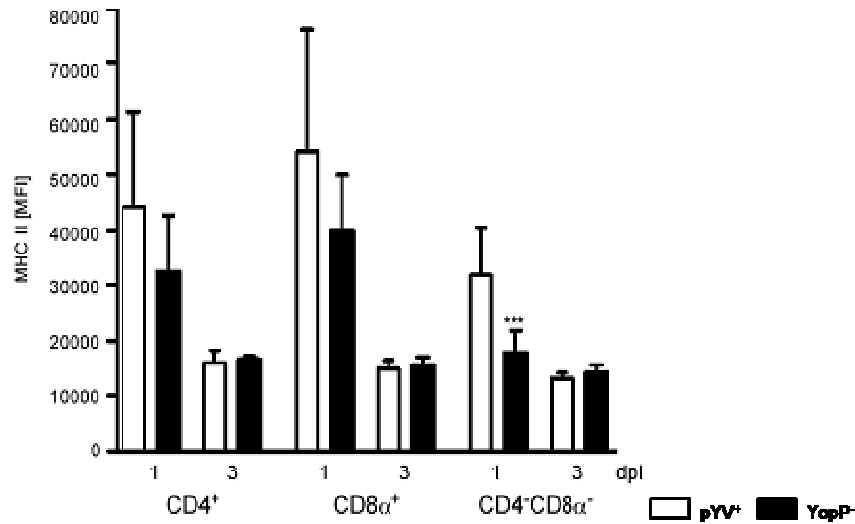


Abb. 51: Expression der MHC-Klasse II-Moleküle nach Infektion mit Ye pYV⁺ Δ yopP

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity = MFI) für die Expression von MHC-II auf CD4⁺, CD8 α ⁺ und DN aus Ye pYV⁺ (weiße Balken) und Ye pYV⁺ Δ yopP (schwarze Balken) infizierten C57BL/6 Mäusen nach 1 und 3 dpi. Daten sind aus zwei Experimente mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe. * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ Δ yopP.

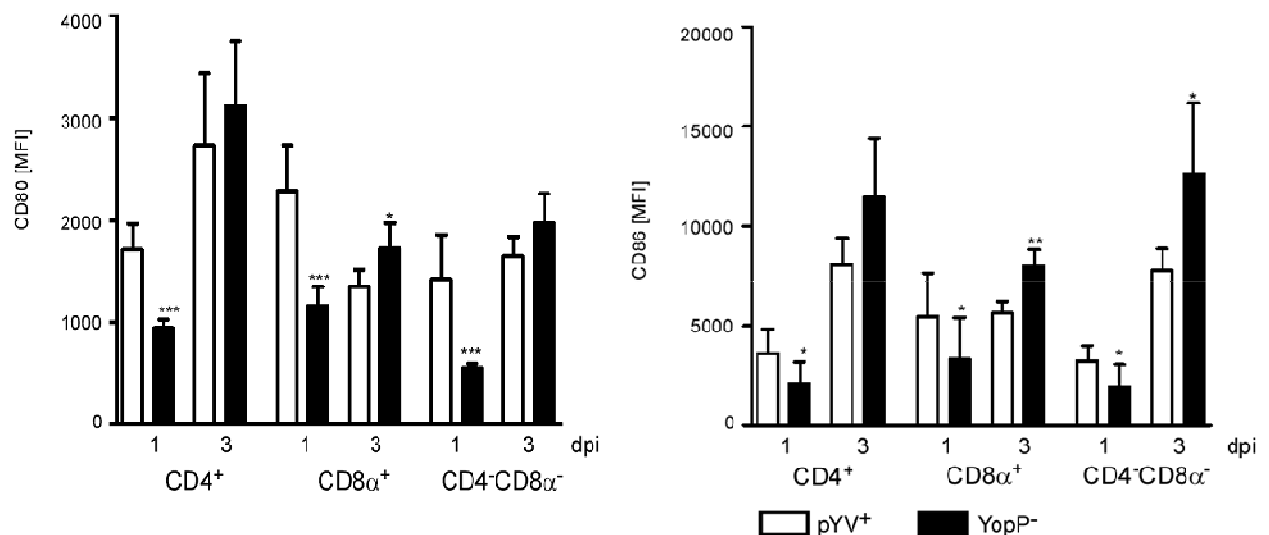


Abb. 52: Expression der kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 nach Infektion mit Ye pYV⁺ Δ yopP

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity = MFI) für die Expression von CD80 (rechts) und CD86 (links) auf CD4⁺, CD8 α ⁺ und DN aus Ye pYV⁺ (weiße Balken) und Ye pYV⁺ Δ yopP-infizierten (schwarze Balken) C57BL/6 Mäusen nach 1 und 3 dpi. Daten sind aus zwei Experimente mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ Δ yopP.

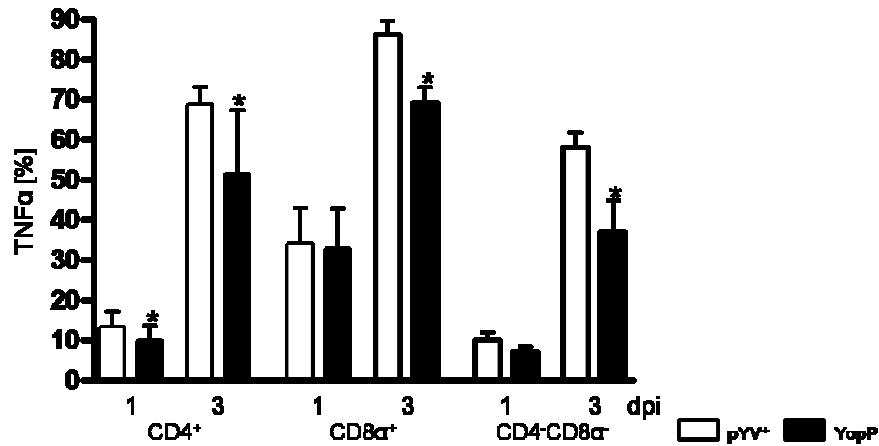


Abb. 53: TNF- α -Produktion in Milz-DCs nach Infektion mit *Ye pYV⁺ Δ yopP* *in vivo*

Dargestellt ist das Zytokinprofil von TNF- α der DC-Subpopulationen in der Milz von *Ye pYV⁺*-infizierten (weiße Balken) und *Ye pYV⁺ Δ yopP*-infizierte (schwarze Balken) C57BL/6 Mäusen nach 1 und 3 dpi. Daten sind aus zwei Experimenten mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe: * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen *Ye pYV⁺* und *Ye pYV⁺ Δ yopP*.

4.2.4 Gesamtzellzahl, Größe und Bakterienmenge in der Milz nach Infektion mit *Ye pYV⁺* und *Ye pYV⁺ Δ yopP*

C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^4 Bakterien infiziert. Zu angegebenen Zeitpunkten (1, 2, 3 dpi) wurden das Gewicht, die Gesamtzellzahlen und die Bakterienanzahl in der Milz ermittelt. Die Analyse der Milz ergab keine Unterschiede im Gewicht, in der Gesamtzellzahl und Keimanzahl zwischen *Ye pYV⁺* und *Ye pYV⁺ Δ yopP* infizierten C57BL/6 Mäusen im Verlauf der Infektion (Abb. 54).

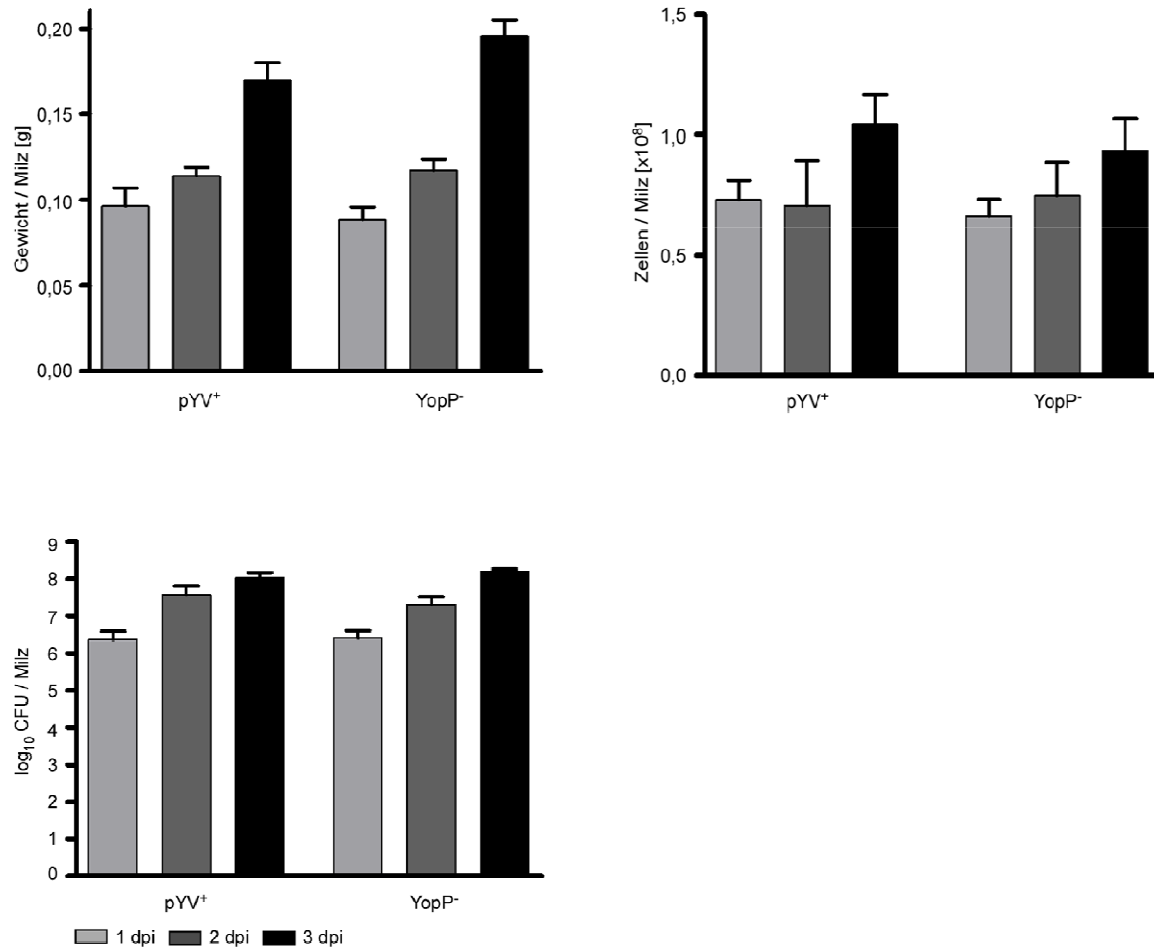


Abb. 54: Analyse der Gesamtzellzahl, Gewicht und Bakterienmenge in der Milz von C57BL/6 Mäusen

C57BL/6 wurden mit *Ye pYV⁺* und *Ye pYV⁺ Δ yopP* (YopP⁻) i.v. infiziert und nach eins bis drei Tage getötet, anschließend Milzgewicht (oben links), Zellzahl (oben rechts) und Bakterienanzahl (unten links) bestimmt.

Ebenfalls konnte kein signifikanter Unterschied in den oben genannten Parametern zwischen C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäusen nach ein und drei dpi beobachtet werden (Abb. 55). Obwohl die mit der *Ye YopP*-Mutante infizierten MyD88^{-/-} Mäuse 3 Tage nach Infektion einen sehr schlechten Allgemeinzustand aufwiesen, konnte keine höhere Bakterienmenge im Vergleich - weder zu den *Ye pYV⁺* infizierten MyD88^{-/-} Mäusen noch zu den infizierten C57BL/6 Mäusen - ermittelt werden. Das bedeutet, dass YopP einen Einfluss auf die Suszeptibilität hat, bei dem der MyD88-Signalweg eine Rolle spielt, da die YopP defiziente Mutante verglichen mit dem Wildtypstamm (*Ye pYV⁺*) *in vivo* nicht attenuiert ist.

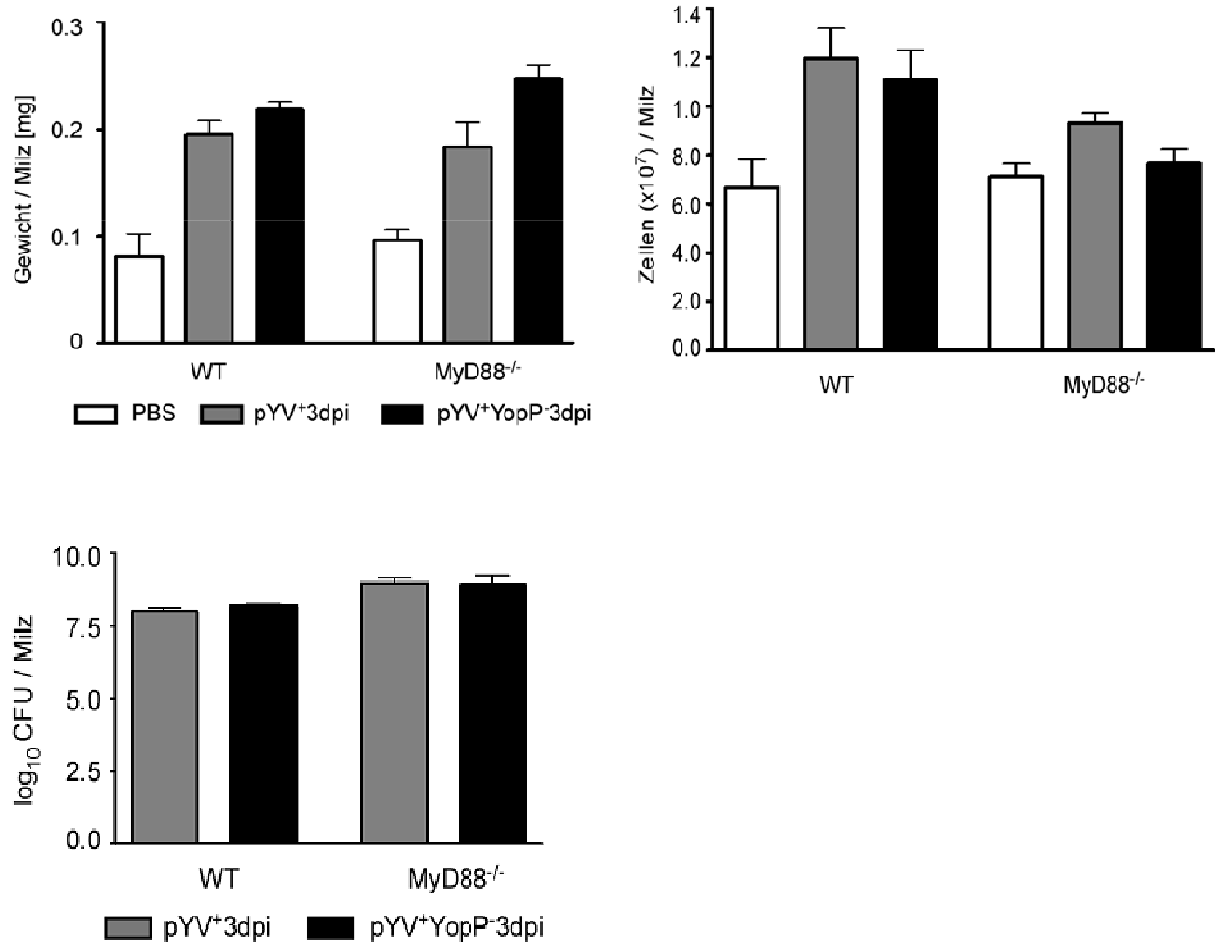


Abb. 55: Analyse der Gesamtzellzahl, Gewicht und Bakterienmenge in der Milz von C57BL/6 und Myd88^{-/-} Mäusen

C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäuse wurden mit Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ΔyopP (YopP⁻) i.v. infiziert und nach ein und drei Tage getötet, Milzgewicht (oben links), Zellzahl (oben rechts) und Bakterienanzahl (unten links) bestimmt.

4.2.5 DC-Subpopulation nach Infektion mit Ye pYV⁺ΔyopP

Um zu untersuchen, ob YopP an der Abnahme der DCs im Verlauf der Infektion *in vivo* beteiligt ist, wurde die DC-Anzahl nach Infektion mit der Ye YopP defizienten Mutante mittels Durchflusszytometer bestimmt und mit den Ergebnissen des Wildtypstammes (Ye pYV⁺) verglichen. Die Gating-Strategie ist in Abb. 30 anhand einer PBS-behandelten Maus dargestellt. Im Vergleich zu den Ye pYV⁺ infizierten Mäusen zeigten die Ye pYV⁺ΔYopP infizierten Mäuse eine signifikant geringere prozentuale Abnahme an CD4⁺DCs ein und zwei Tage nach Infektion auf. Ebenfalls konnte eine signifikant geringere prozentuale Zunahme der DN DCs ein und zwei Tage nach Infektion beobachtet werden. Drei Tage nach Infektion konnte im prozentualen Anteil der DC-Subpopulation in der Milz keine Differenz mehr zwischen Mäusen mit Infektion mit Ye Wildtypstamm und YopP defizienten Mutante ermittelt werden (Abb. 56 oben). Eine signifikant geringere absolute Zellzahl der DC Subpopulationen präsentierte sich ein Tag nach Infektion, die sich jedoch im weiteren Verlauf nicht mehr nachweisen ließ (Abb. 56 unten).

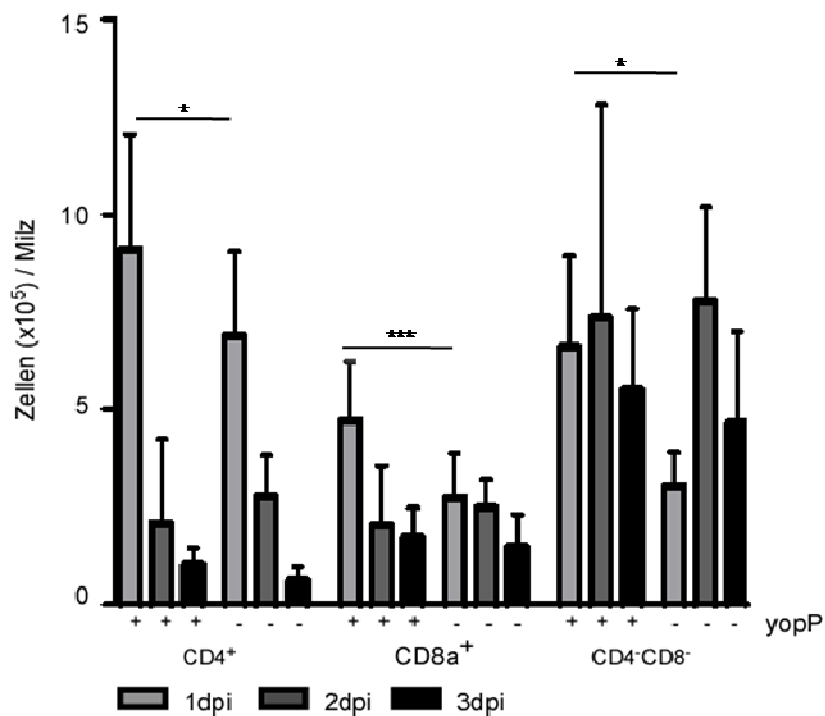
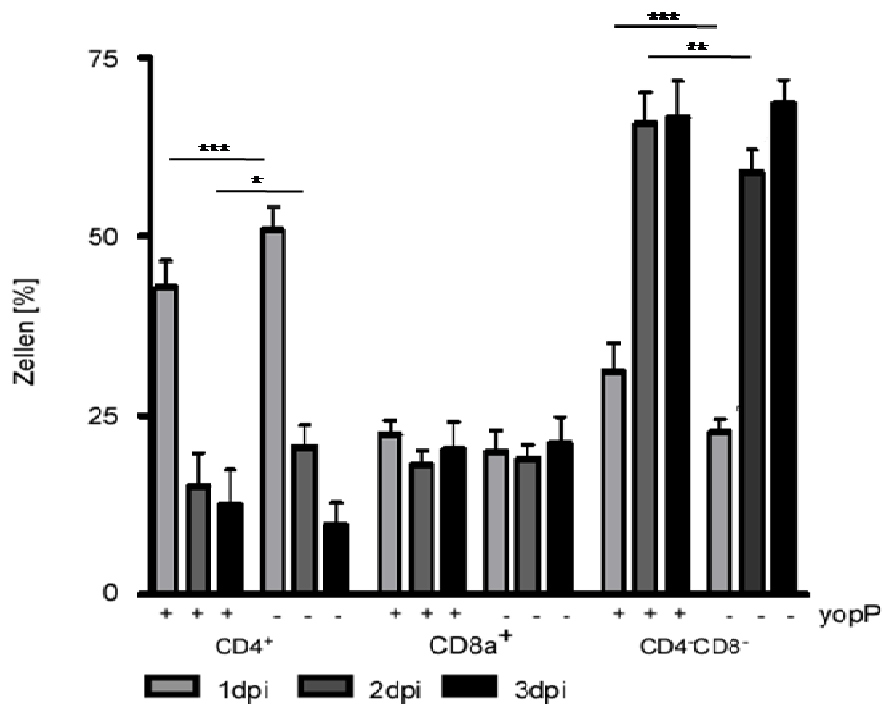


Abb. 56: Analyse der DC Subpopulation nach Infektion mit Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ΔYopP
 Mäuse wurden mit Ye pYV⁺ (+) und Ye pYV⁺ΔYopP (-) i.v. infiziert. Nach ein bis drei Tage wurde die Milz entnommen, die Zellen gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8α, die toten Zellen mittels 7-AAD ausgeschlossen und die Anzahl der DC-Subpopulationen durchflusszytometrisch ermittelt. Der prozentuale Anteil (oben) und die absolute Zellzahl (unten) der DC-Subpopulationen in der Milz sind dargestellt. 1 dpi (hellgraue Balken), 2 dpi (dunkelgraue Balken), 3 dpi (schwarze Balken). Daten sind aus vier Experimenten mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ΔYopP.

Die Analyse von DC-Subpopulationen aus MyD88^{-/-} Mäusen drei Tage nach Infektion mit dem Ye Wildtypstamm und mit der Ye YopP defizienten Mutanten ist in Abb. 57 dargestellt. Es wurden keine Unterschiede der DC Subpopulationen von Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ΔYopP infizierten Wildtyp-Mäusen nach drei Tagen beobachtet (Abb. 56 und Abb. 57). Im Gegensatz dazu konnten signifikante Unterschiede bei gleichen Konditionen in MyD88^{-/-} Mäusen gefunden werden. Im Vergleich zu den Ye pYV⁺ infizierten MyD88^{-/-} Mäusen zeigten die Ye pYV⁺ΔYopP infizierten MyD88^{-/-} Mäuse einen signifikant geringeren prozentualen Anteil an CD4⁺DCs und CD8α⁺ drei Tage nach Infektion auf. Die DN DCs wiesen eine signifikante Zunahme in Ye pYV⁺ΔYopP infizierten MyD88^{-/-} Mäuse (ca. 88%) auf im Vergleich zu den Ye pYV⁺ infizierten MyD88^{-/-} Mäusen (ca. 60 %). Diese Unterschiede werden jedoch nicht durch die absolute Zellzahl-Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass YopP den Verlust der CD4⁺DCs und CD8⁺DCs und die Zunahme der DN DCs 24 h nach Infektion unwesentlich beeinflusst. Dieser Einfluss war jedoch ab dem 2. Tag nach Infektion nicht mehr zu sehen. Eine wichtige Rolle kommt hierbei dem MyD88-Signalweg zu, da der Verlust der CD4⁺DCs und der CD8a⁺DCs höher war, wenn dieser ausgeschaltet war und YopP fehlte. Zugleich konnte dabei eine extreme Zunahme der DN DC beobachtet werden.

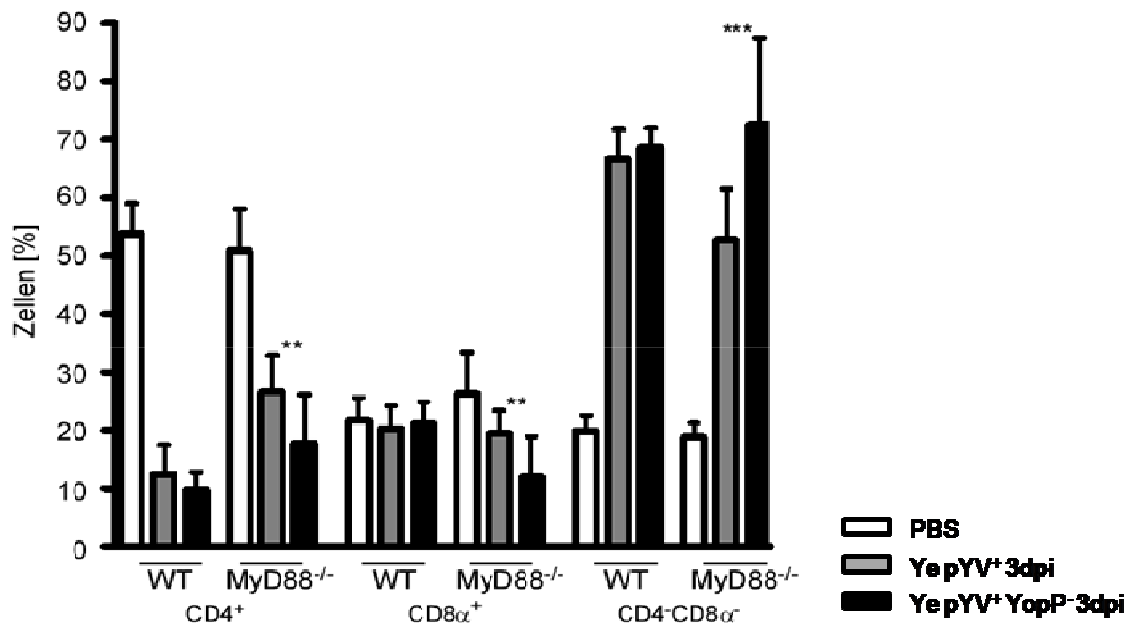


Abb. 57: Analyse der DC Subpopulation nach Infektion mit Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ΔYopP in C57BL/6 und Myd88^{-/-} Mäuse

C57BL/6 (WT) und Myd88^{-/-} Mäuse wurden mit Ye pYV⁺ (graue Balken) und Ye pYV⁺ΔYopP (schwarze Balken) i.v. infiziert bzw. den Kontrollmäusen wurde PBS i.v. injiziert (weiße Balken). Nach 3 Tagen wurde die Milz entnommen, die Zellen gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8α, die toten Zellen mittels 7-AAD ausgeschlossen und die Anzahl der DC-Subpopulationen durchflusszytometrisch ermittelt. Der prozentuale Anteil der DC-Subpopulationen in der Milz ist dargestellt. Daten sind aus drei Experimenten mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen Ye pYV⁺ und der Ye YopP defizienten Mutante.

4.2.6 Nekrose und Apoptose nach Infektion mit Ye pYV⁺ΔyopP *in vivo*

In vitro Experimente zeigten, dass die durch YopP vermittelte Blockierung der NF-κB- und MAPK-anhängigen Signalkaskade zur Apoptose in Makrophagen und DCs führt [136,140,169,170]. Um herauszufinden, ob YopP Zelltod durch Apoptose *in vivo* induziert, wurden C57BL/6 Mäuse mit Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ΔyopP i.v. infiziert und zu angegebenen Zeitpunkten die toten bzw. apoptotischen DCs aus der Milz durch 7-AAD und die Fluoreszenzmarkierung von aktivierter Caspase 3/7 im Durchflusszytometer bestimmt. Zusätzlich wurde der DC-Zelltod in der Milz von MyD88^{-/-} Mäusen nach Infektion mit der Ye YopP defizienten Mutanten analysiert, da aus der Literatur bekannt ist, dass der Zelltod von Makrophagen durch YopP über den TLR4 / Myd88-Signalweg vermittelt wird [129].

Abb. 58 zeigt die Ergebnisse der Analyse des Zelltodes der DC-Subpopulationen nach Infektion mit dem Ye Wildtypstamm und der YopP defizienten Mutante in C57BL/6 Mäusen. Nach 24 h und 48 h waren keine Unterschiede im prozentualen Zelltodanteil aller drei DC-Subpopulationen zu erkennen. Der prozentuale Anteil an 7-AAD⁺CD4⁺DCs war um ~ 15 % geringer drei Tage nach Infektion in Ye pYV⁺ΔyopP-infizierten Mäusen verglichen mit denen aus Ye pYV⁺ infizierten Mäusen. Die absolute Zellzahl an 7-AAD⁺CD4⁺DCs war ebenfalls niedriger in den Ye pYV⁺ΔyopP-infizierten Mäusen (nur $\sim 0,5 \times 10^5$ statt $\sim 1,25 \times 10^5$ 7-AAD⁺CD4⁺DCs) nach drei Tagen. Der prozentuale Vergleich der 7-AAD⁺DN DCs aus Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ΔyopP-infizierten Mäusen zeigte signifikante Unterschiede drei Tage nach Infektion. Hier wurden ~ 10 % weniger tote DN DCs in Ye pYV⁺ΔyopP-infizierten Mäusen im Vergleich mit Ye pYV⁺ infizierten Mäuse gefunden. Die Berechnung der absoluten Zellzahl DN DCs ergab an Tag 2 ($\sim 0,5 \times 10^5$ statt $\sim 1,25 \times 10^5$) und an Tag 3 ($\sim 0,5 \times 10^5$ statt $\sim 1 \times 10^5$) weniger tote Zellen. Bei den 7-AAD⁺CD8α⁺DCs gab es weder im prozentualen Anteil noch in der absoluten Zellzahl Unterschiede. Das bedeutet, dass YopP drei Tage nach Infektion den Zelltod (Nekrose) von CD4⁺DCs und DN DCs induziert.

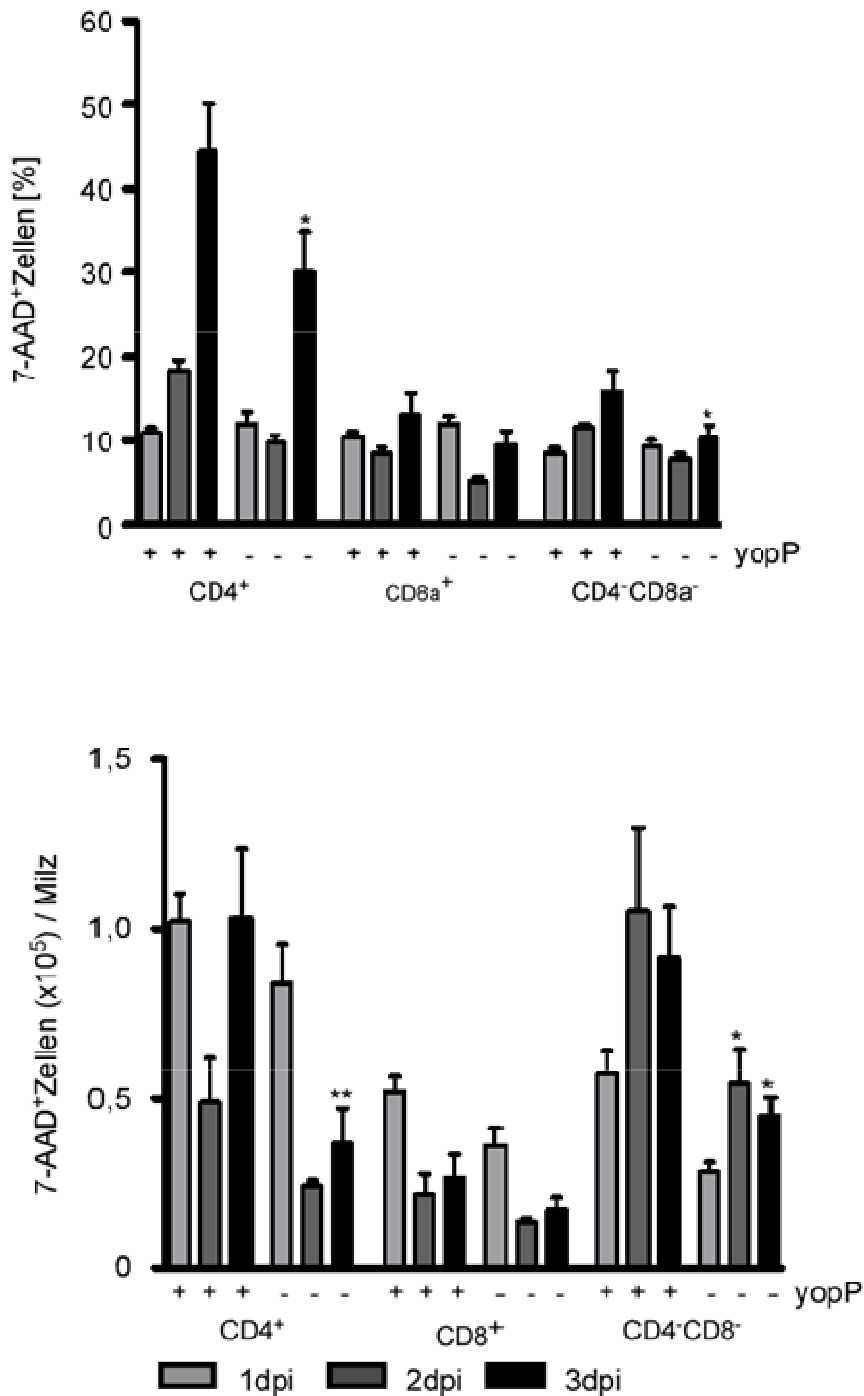


Abb. 58: Untersuchung des Zelltodverhaltens nach Infektion von C57BL/6 DC-Subpopulationen mit Ye pYV+ΔYopP

C57BL/6 Mäuse wurden mit Ye pYV⁺ (+) bzw. mit Ye pYV⁺ΔYopP (-) i.v. infiziert. Nach 24 h bis drei Tagen wurde die Milz entnommen, gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8α und der Zelltod durch 7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil (oben) und die absolute Zellzahl (unten) des Zelltodes von DC-Subpopulationen in der Milz. Daten sind aus vier Experimenten mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺ΔYopP.

Abb. 59 zeigt die Ergebnisse aus dem Vergleich des Zelltodes der DC-Subpopulationen nach Infektion mit dem Ye Wildtypstamm und der YopP defizienten Mutante drei Tage nach Infektion in C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäusen. Im Vergleich mit pYV⁺ infizierten MyD88^{-/-} Mäusen verdoppelte sich der Anteil der 7-AAD⁺DN DCs in Ye pYV⁺ΔyopP-infizierten Mäusen. Die Berechnung der absoluten Zellzahl an DN DCs ergab signifikant mehr tote Zellen (~ 1,25 x 10⁵ statt ~0,4 x 10⁵). Eine weitere signifikante Zunahme konnte in der Anzahl an 7-AAD⁺CD4⁺DCs in Ye pYV⁺ΔyopP-infizierten MyD88^{-/-} Mäusen verglichen mit Ye pYV infizierten MyD88^{-/-} Mäusen beobachtet werden. Bei den 7-AAD⁺CD8α⁺DCs aus MyD88^{-/-} Mäuse gab es weder im prozentualen Anteil noch in der absoluten Zellzahl Unterschiede im Vergleich mit den Ye pYV⁺ infizierten Mäusen. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass YopP Zelltod von CD4+DCs und DN DCs induziert. Dieser ist bei den CD4⁺DCs MyD88^{-/-} abhängig. Interessanterweise nimmt der Zelltod von CD4+DCs und DN DCs bei Fehlen von YopP und des MyD88-Signalweges zu. Das deutet daraufhin, dass ein oder mehrere Pathogenitätsfaktoren den Zelltod unabhängig vom MyD88-Signalweg induzieren können.

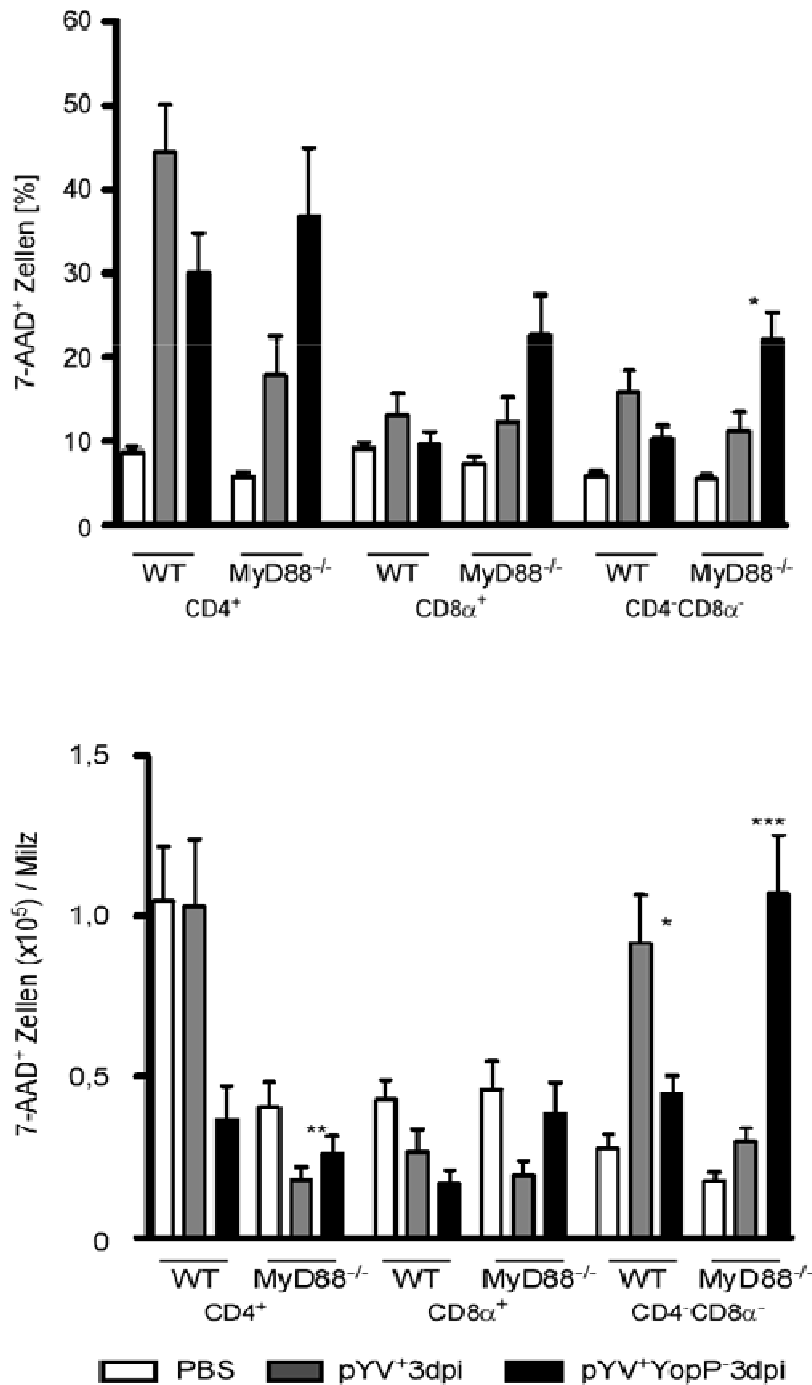


Abb. 59: Untersuchung des Zelltodverhaltens nach Infektion von C57BL/6 und MyD88^{-/-} DC-Subpopulationen mit Ye pYV+ Δ YopP

Mäuse wurden mit Ye pYV⁺ (+) oder mit Ye pYV⁺ Δ YopP (-) i.v. infiziert bzw. wurde PBS injiziert. Nach drei Tagen wurde die Milz entnommen, gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8 α und der Zelltod durch 7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil (oben) und die absolute Zellzahl (unten) am Zelltod von DC-Subpopulationen in der Milz von C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäusen. Daten sind aus drei Experimenten mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen Ye pYV⁺ und der Ye YopP defizienten Mutante.

Nachdem gezeigt wurde, dass YopP den Zelltod (Nekrose) *in vivo* beeinflusst, sollte untersucht werden, ob YopP Apoptose in DCs *in vivo* induziert. In Abb. 60 ist das Ergebnis des prozentualen Anteil und der absoluten Zellzahl an apoptotische DC-Subpopulationen gezeigt. Im prozentualen Anteil der Caspase3/7⁺CD4⁺ und Caspase3/7⁺CD8a⁺DCs in der Milz zwischen Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺YopP⁻ infizierten Mäusen 24 nach Infektion konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Wohingegen der Anteil der Caspase3/7⁺DN DCs um 10 % abnimmt in den Ye pYV⁺YopP⁻ infizierten Mäusen verglichen mit den Ye pYV⁺ infizierten Mäusen. Der signifikante Unterschied der Caspase3/7⁺DN DCs in der Milz zwischen Ye pYV⁺ und Ye pYV⁺YopP⁻ infizierten Mäusen konnte drei Tage nach Infektion nicht mehr ermittelt werden. Der Anteil an Caspase3/7⁺CD4⁺DCs und Caspase3/7⁺CD8a⁺DCs nimmt drei Tage nach Infektion mit Ye pYV⁺YopP⁻ infizierten Mäusen (ca. 15 % und ca. 8 %) signifikant ab im Vergleich mit den Ye pYV⁺ infizierten Mäusen (ca. 28 % und ca. 12 %). Die Analyse der Zellzahl zeigte eine Abnahme der Caspase3/7⁺DN DCs in Ye pYV⁺YopP⁻ infizierten Mäusen (ca. $1,2 \times 10^5$) im Vergleich mit den Ye pYV⁺ infizierten Mäusen (ca. $2,5 \times 10^5$) 24 h nach Infektion. Ebenso konnte eine signifikante Abnahme der Zellzahl an Caspase3/7⁺CD8a⁺DCs in der Milz von Ye pYV⁺YopP⁻ infizierten Mäusen verglichen mit den Ye pYV⁺ infizierte Mäuse beobachtet werden. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Infektion YopP für die Apoptose in den DC Subpopulationen mitverantwortlich ist.

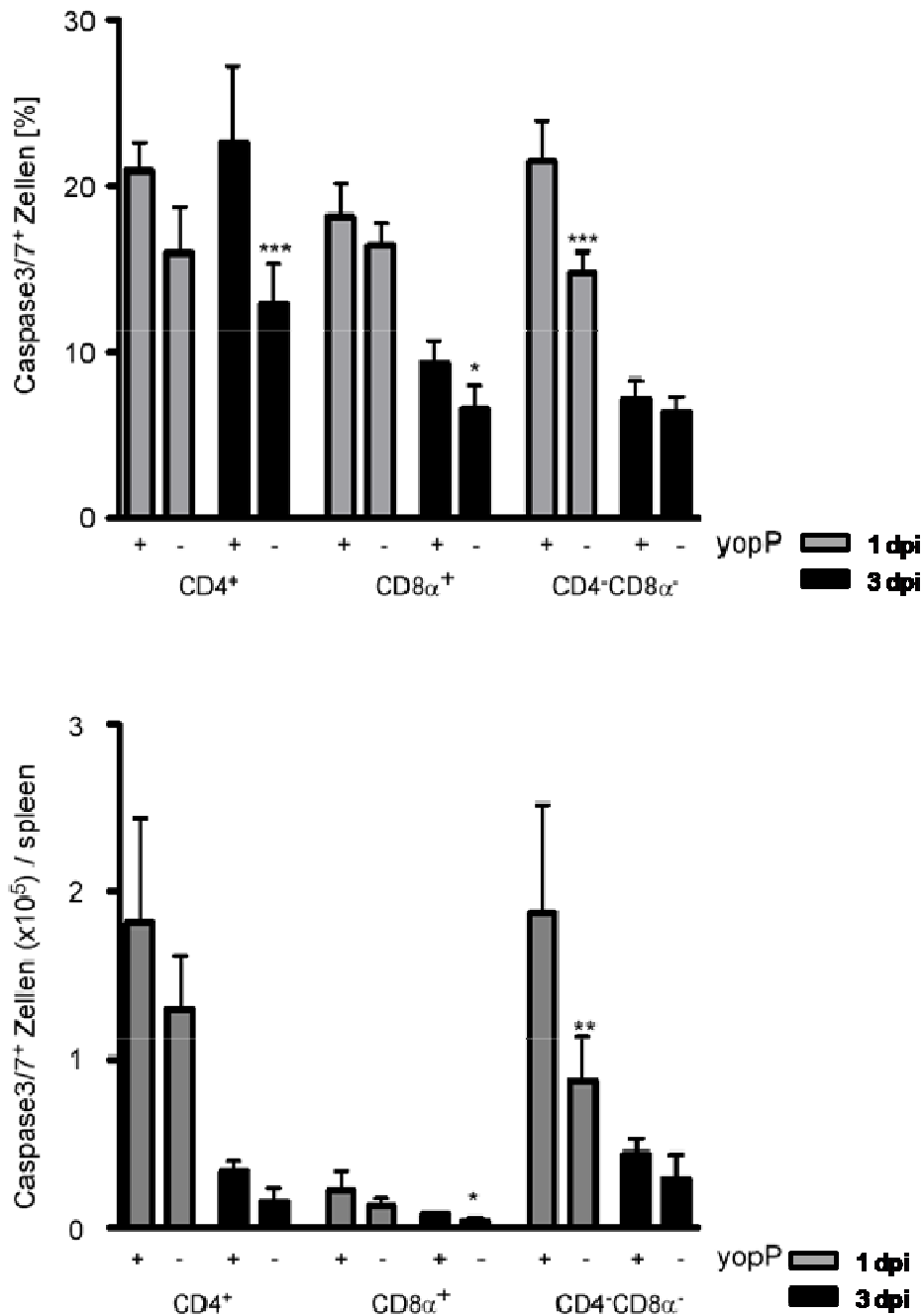


Abb. 60: Untersuchung des Apoptoseverhaltens nach Infektion von C57BL/6 DC-Subpopulationen mit *Ye pYV⁺ΔYopP* *in vivo*

C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^4 *Ye pYV⁺* (+) oder *Ye pYV⁺ΔyopP* (-) i.v. infiziert. Nach 24 h (graue Balken) bzw. drei Tage (schwarze Balken) wurde die Milz entnommen, gefärbt mit Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8α und der Anteil der Apoptose mittels Caspase3/7-Markierung durchflusszytometrisch bestimmt. Um die nekrotischen Zellen auszuschließen, wurde mit 7-AAD gefärbt. Die Graphiken zeigen den prozentualen Anteil (oben) und die absolute Zellzahl (unten) der jeweiligen Caspase3/7⁺DC-Subpopulation im Verlauf der Infektion mit *Ye*. Daten sind aus zwei Experimenten mit mindest. 3 Mäusen pro Gruppe * präsentieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen *Ye pYV⁺* und der *Ye YopP* defizienten Mutante.

5 Diskussion

Zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort gegen Bakterien sind DCs als Vermittler zwischen angeborener und erworbener Immunität von wesentlicher Bedeutung. Deshalb ist die Aufklärung der exakten Rolle der DC Subtypen in der Immunantwort bei Infektionsprozessen wichtig. *Yersinia enterocolitica* diente in dieser Arbeit als Modellorganismus zur Aufklärung von bakteriellen Interaktionen mit Dendritischen Zellen. Ye hemmt das angeborene Immunsystem, indem die Bakterien die Phagozytose von Neutrophilen und die Lyse des Komplementsystems hemmen (Abb. 7). Deshalb spielen vor allem die T-Zellen des adaptiven Immunsystems eine essentielle Rolle, da sie durch IFN- γ Produktion Makrophagen aktivieren, die letztendlich die Ye eliminieren.

5.1 Ye beeinflusst die Funktion und Entwicklung der DC-Subpopulation *in vivo*

5.1.1 Ye beeinflusst die Funktion der DC Subpopulationen

Wie oben erwähnt ist für eine effiziente Bekämpfung einer Infektion mit Ye das adaptive Immunssystem notwendig; vor allem ist die Aktivierung von T-Zellen essentiell. Da die Aktivierung naiver T-Zellen durch DCs erfolgt, könnten DCs bei einer Infektion mit Ye eine entscheidende Rolle für den Schweregrad der Infektion zuteil kommen. *In vitro* Analysen ergaben, dass Ye die Aktivierung der CD4⁺T-Zellen durch DCs vollkommen verhindern [136]. Dieser Funktionsverlust ist die Folge der Beeinträchtigung der Antigenaufnahme, Antigenprozessierung, DC-Maturation, Zytokinproduktion und des erhöhten Zelltod- bzw. Apoptoseverhalten der DCs während der Infektion mit Ye. Die Infektion mit Ye ist jedoch im Allgemeinen eine selbstlimitierende Erkrankung [76]. Daher sollte in dieser Arbeit, die Funktionen der DCs *in vivo* analysiert werden, um zu erfahren, ob die DCs fähig sind, die T-Zellen zu aktivieren und in wie weit die Funktion der DCs durch eine Infektion mit Ye beeinträchtigt wird.

Von den CD8 α ⁺DCs ist bekannt, dass sie Antigene den CD4⁺- und CD8⁺T-Zellen präsentieren, wohingegen die beiden anderen DC-Subpopulationen Antigene nur den CD4⁺T-Zellen präsentieren können [211]. Somit spielen CD8 α ⁺DCs eine wichtige

Rolle bei der Antigenpräsentation und beim T-Zell-Priming bei viralen Infektionen und Infektionen mit intrazellulären Pathogenen, wie z.B. *Listeria monocytogenes* [171,172], *Salmonella typhimurium* [5] und *Toxoplasma gondii* [173]. Die Rolle in der Immunabwehr von extrazellulären Pathogenen *in vivo* ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Daher war der erste Schritt in dieser Arbeit die T-Zellaktivierung durch die DC-Subpopulationen *in vivo* zu analysieren. Die Analyse der T-Zellproliferation zeigt eine reduzierte Aktivierung nach Infektion mit Yersinien. Es kam zwar nicht zur vollständigen Hemmung der T-Zellproliferation wie Daten von *in vitro* Untersuchungen gezeigt haben [136], jedoch konnte ein deutlicher Effekt auf die DCs durch Ye gefunden werden. Welche DC Subpopulation für die reduzierte T-Zellaktivierung verantwortlich ist, sollte in der weiteren Analyse ermittelt werden. Dafür wurden gesortete DCs aus PBS-behandelten und Yersinien-infizierten Mäusen mit CFSE-CD4⁺T-Zellen in Gegenwart von OVA-Protein kokultiviert. Vor allem die CD8α⁺DCs aus Yersinien-infizierten Mäusen wurden bei der T-Zellaktivierung beeinträchtigt, wohingegen die CD4⁺ DCs und DN DCs keine Hemmung aufwiesen. Der Einsatz von OVA-Peptid statt OVA-Protein zeigte keine Hemmung in der T-Zellproliferation durch Ye in allen drei DC-Subpopulationen. Dies deutet darauf hin, dass die Antigenaufnahme und Antigenprozessierung durch Yersinien beeinträchtigt wird. Cheminay et al [209] und Bueno et al [210] zeigten, dass die Hemmung der Antigenprozessierung bzw. die Antigenpresentation der DCs nach einer Infektion mit *Salmonella enterica* serovar Typhimurium zu einer Abnahme der T-Zell-Antwort führt.

Die Hemmung der Antigenaufnahme bzw. Antigenprozessierung durch DCs könnte auch die Ursache für die reduzierte T-Zellaktivierung bei einer Infektion mit Ye sein. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, nehmen DCs im unreifen Zustand durch Makropinozytose, Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose Antigene auf [174]. Es ist bekannt, dass die CD8α⁺DCs am effektivsten Antigene aufnehmen [56]. Um den Einfluss auf die Antigenaufnahme und -prozessierung durch Yersinien zu analysieren, wurde den Mäusen ein und drei Tage nach Infektion mit Ye OVA-Alexa647 und OVA-DQ intravenös appliziert. Die Analyse der Antigenaufnahme und -prozessierung ergab, dass es signifikant weniger OVA-Alexa647⁺CD8α⁺DCs sowie OVA-AlexaFluor647⁺OVA-DQ⁺CD8α⁺DCs in Yersinien-infizierte Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen gibt. CD4⁺DCs und DN DCs nehmen dagegen mehr Antigen auf im Verlauf der Infektion. Das bedeutet, dass hauptsächlich die Antigenaufnahme

und Antigenprozessierung der $CD8\alpha^+$ DCs durch eine Infektion mit *Ye in vivo* beeinträchtigt wird.

DCs kommen im Organismus in verschiedenen Reifegraden vor, welches durch ihre Funktionen als Immunzellen bedingt ist. Nach der Antigenaufnahme werden die DCs aktiviert und durchlaufen den Prozess der Maturation [175]. Die Maturation ist assoziiert mit einer schnellen Migration der Antigen-beladenen DCs in die T-Zell-reichen Zonen der sekundären lymphatischen Organe. Außerdem fördert die Maturation der DCs die Expression von MHC-II-Molekülen und der kostimulierenden Moleküle wie, CD80 und CD86, welche an CD28 und CTLA-4 von T-Zellen binden. Diese Veränderungen führen zu einer erhöhten Kapazität der DCs T-Zellen zu aktivieren [2,175]. Die Maturation der DCs hängt im Wesentlichen von verschiedenen Faktoren bzw. Stimuli wie z.B. Zytokine (GM-CSF), Viren und Bakterien ab, die bei einer Entzündung oder durch Zelltod entstehen. Autenrieth et al. konnten zeigen, dass die Expression der Maturationsmarker MHC-II, CD80 und CD86 einen Tag nach Infektion mit *Ye* auf allen DC-Subpopulationen ansteigt, wohingegen an Tag drei nach Infektion die Expression ähnlich den Kontrollmäusen war [104]. Dies weist darauf hin, dass *Ye* die Maturation der DCs 24 h nach Infektion induziert, anschließend jedoch hemmt oder neue DCs in die Milz migrieren, die noch nicht maturiert sind. Untersuchungen mit Salmonellen-infizierten Mäusen zeigten, dass die Expression von CD86 und CD40 auf $CD8\alpha^+$ DCs ansteigt, jedoch nicht von CD80. Im Kontrast zu CD40 nimmt die Expression der kostimulierenden Molekülen CD80 und CD86 bei $CD4^+$ DCs und DN DCs außerordentlich zu [184]. Das bedeutet, dass verschiedene bakterielle Stimuli die Maturation *in vivo* unterschiedlich beeinflussen können.

Ein weiterer Mechanismus, um die T-Zell-Aktivierung zu verhindern und die Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen in Th1- oder Th2-Zellen zu beeinflussen, ist die Hemmung der Zytokinproduktion von $CD8\alpha^+$ DCs und $CD8\alpha^-$ DCs im Verlauf der Infektion [41,176]. DCs können selbst eine Vielfalt an Zytokinen sekretieren. Zu den wichtigsten Zytokinen gehören TNF- α , IL-6 und IL-12 bei Entzündungsreaktionen [177]. Zu einem erhöhten TNF- α -Spiegel im Serum kommt es nach einer Stimulation mit Bakterien oder bakteriellen Molekülen wie z.B. LPS, die zu Apoptose, Zellproliferation und Sekretion von weiteren Zytokinen durch andere Immunzellen führen. IL-6 ist beteiligt an der Akutphase-Reaktion, Immunabwehr bei Entzündungen

[178] und Differenzierung der T-Zellantwort [179]. Das Zytokin IL-12 besitzt einen bedeutenden Th1-polarisierenden Einfluss und induziert in T-Zellen die Produktion von IFN- γ [180]. Dies kann z.B. bei einer Infektion mit Ye zur Aktivierung der Makrophagen führen, die Yersinien töten. Zytokinanalysen *in vitro* zeigten jedoch eine Hemmung in der Produktion von TNF- α , IL-6, IL-12 von DCs durch Ye [136]. Infolgedessen wurde in Yersinien-infizierten Mäusen die Produktion der proinflammatorischen Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-12) durch die DCs *in vivo* von Autenrieth et al. untersucht [104]. Einen Tag nach Infektion wurde eine erhöhte Zytokinsekretion durch CD4⁺DCs und DN DCs im Vergleich zu den Kontrollmäusen gemessen. Dagegen zeigten die CD8 α ⁺DCs eine Abnahme an den oben genannten Zytokine, aus der sich eine Beteiligung an der reduzierten T-Zellaktivierung während einer Infektion mit Ye ableiten lässt. Die höchste Produktion von IL-12 zeigten unter den DC-Subpopulationen die CD8 α ⁺DCs wobei verschiedene Stimuli diese ändern können. *Escherichia coli* LPS induziert IL-12 Produktion durch CD8 α ⁺DCs, wahrscheinlich durch TLR4, wobei *Porphyromonas gingivalis* LPS das Gegenteil bewirkt. Die Produktion von IL-6 und TNF- α durch DCs wird dagegen von LPS beider Bakterienstämme gefördert [181]. Einen weiteren Unterschied in der Zytokinproduktion von DCs konnten Huang et al. [182] finden. Die IL-12 Produktion war nach Behandlung mit hitzegetöteter *Brucella abortus* bei CD8 α ⁺DCs im Vergleich zu CD8 α ⁻DCs höher. McKee et al. [183] konnten zeigen, dass unreife DCs durch eine Infektion mit *T. gondii* in ihrer Funktion gestört und unfähig werden, IL-12 und TNF- α zu sekretieren und CD4⁺T-Zellen zu aktivieren. Das bedeutet, dass die Sekretion von Zytokinen durch die DC-Subpopulationen unterschiedlich moduliert werden kann und dies abhängig vom mikrobiellen Stimulus ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die reduzierte T-Zellproliferation nach einer Infektion mit Ye im Mausmodell durch die Beeinträchtigungen bzw. Modulationen von entscheidenden Funktionen der DCs verursacht werden kann (Abb. 61). Dabei hemmen die Yersinien vor allem die Antigenaufnahme, Antigenprozessierung und Zytokinproduktion der CD8 α ⁺DCs, um der Eliminierung durch die adaptive Immunantwort zu entgehen.

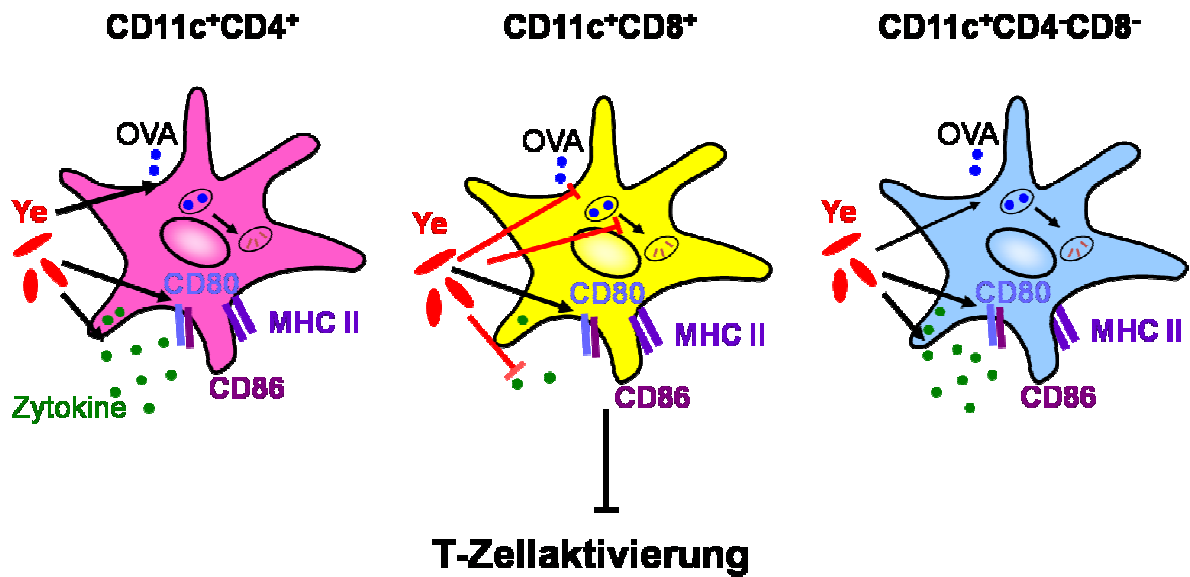


Abb. 61: Hemmung der Funktionen der DC Subpopulationen nach Infektion mit *Ye in vivo*

5.1.6 *Ye* beeinflusst die Entwicklung der DC Subpopulationen

Sundquist et al. [184] zeigten, dass bei einer Infektion von Mäusen mit *S. typhimurium* die Zellzahl von DC-Subpopulationen extrem zunimmt. Um zu analysieren, ob sich die Zellzahl oder die Zusammensetzung der DC-Subpopulationen nach einer Infektion mit *Ye* verändert, wurden Mäuse infiziert und die DC-Subpopulationen mittel Durchflusszytometrie bestimmt. Interessanterweise zeigte jedoch die Analyse der Zellzahl eine deutliche Abnahme der CD4⁺DCs und CD8α⁺DCs, wohingegen die DN DCs eine Zunahme in der Zellzahl im Verlauf der Infektion mit *Ye* aufweisen. Dieser Effekt ist in TLR2^{-/-}4^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäusen nicht zu ermitteln. Daraus kann man schließen, dass *Ye* unterschiedliche Effekte auf die DC-Subpopulationen in der Milz *in vivo* besitzt und der Verlust abhängig vom TLR4-TRIF Signalweg ist. Durch die intravenöse Applikation von hitze-inaktivierten Yersinien im Mausmodell konnte hier gezeigt werden, dass der Verlust der DCs kein Effekt durch bakterielles LPS von *Ye* ist. Die Interaktion vitaler Erreger mit den DCs wird benötigt, damit es zu diesem DC-Verlust kommt. Bei Infektionen mit *E. coli* wurde ebenfalls eine Abnahme der CD4⁺DCs und CD8α⁺DCs gefunden, die durch Zelltod erklärt werden konnte, der ebenfalls von TLR4 und dem TRIF-Signalweg abhängig ist [141]. Auch Gröbner et al. [128,129] konnten zeigen, dass *Ye* programmierten Zelltod (Apoptose) und nekrotischen Zelltod von DCs induziert, allerdings in *in vitro*

Experimenten. Daher wurden in dieser Arbeit der Zelltod und die Apoptose der DC-Subpopulation im Verlauf der Infektionen mit Ye analysiert. Es konnte eine signifikante Zunahme des Zelltodes bei allen drei Subpopulationen prozentual festgestellt werden, vor allem drei Tage nach Infektion. Im Gegensatz dazu konnte dieses Ergebniss nicht durch die absolute Zellzahl bestätigt werden. Hier nahm die Zellzahl an toten CD4⁺DCs und CD8 α ⁺DCs zwei Tage nach Infektion sogar ab. Im Kontrast dazu stieg die Anzahl der toten DN DCs im Verlauf der Infektion an. Interessanterweise konnte im Vergleich in den MyD88^{-/-} Mäusen kein prozentualer Anstieg des Zelltodes in allen drei Subpopulationen drei Tage nach Infektion festgestellt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass *Salmonella typhimurium* bei oraler Infektion hauptsächlich den Zelltod von CD8 α ⁺DCs über den MyD88 und TNFR1 Signalweg induziert, wohingegen dieser Effekt nicht in den beiden anderen DC Subpopulationen induziert wird [143]. Die Untersuchungen der Apoptose im Verlauf einer Infektion mit Ye ergaben einen prozentualen Anstieg an apoptotischen CD4⁺DCs einen und drei Tage nach Infektion. Ebenfalls konnte eine Zunahme an apoptotischen CD8 α ⁺DCs und DN DCs einen Tag nach Infektion ermittelt werden. Insgesamt steigt die Anzahl der toten bzw. apoptotischen CD4⁺DCs und CD8 α ⁺DCs zwar im Verlauf der Infektion leicht an, kann jedoch den extremen Verlust der beiden DC Subpopulationen bei der Infektion nicht erklären. Somit stellte sich die Frage, wodurch die Yersinien die Anzahl der DC Subpopulationen modulieren können, wenn weder Apoptose noch Nekrose hauptsächlich verantwortlich gemacht werden können. Durch die Zunahme von CD11c^{inter} Zellen im Verlauf der Infektion [Daten bisher unveröffentlicht] ist es naheliegend, dass hinter dem Verlust der CD4⁺DCs und CD8 α ⁺DCs eine Downregulation der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 zu vermuten ist. Um dies zu untersuchen wurden Milz-DCs mit den Yersinien *in vitro* kultiviert und die DCs anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Es konnte keine Veränderung in der Anzahl der DCs ermittelt werden. Daher kann der Grund für den extremen Verlust auch nicht bei der Downregulation der Oberflächenmarker der DCs liegen. Weitere Ursachen für den Verlust der DCs könnten durch Beeinträchtigungen des Turnovers der DCs, in der Rekrutierung und Entwicklung der DC-Progenitorzellen während einer Infektion mit Ye liegen. Um zu analysieren, ob sich der Turnover der DC Subpopulationen während der Infektion mit Ye verändert bzw. sich die DCs schneller oder langsamer teilen, wurde den Mäusen nach der Infektion der Proliferationsmarker BrdU täglich intravenös verabreicht. Den

Kontrollmäusen wurde PBS statt Ye appliziert. Der Einbau des Thymidinanalogs in die DNS der DC Subpopulationen wurde mittels Durchflusszytometer bestimmt. Im steady state beträgt die Halbwertszeit der CD8 α ⁺DCs in der Milz 1,5 Tage, die der CD8 α ⁻DCs 3 Tage. Die CD8 α ⁺DCs werden nach drei Tagen durch neue CD8 α ⁺DCs ersetzt, wohingegen die CD8 α ⁻DCs einen langsameren Turnover aufweisen [163]. Die BrdU-Einbauraten und somit der Turnover der DC-Subpopulationen nahmen im Verlauf der Infektion mit Yersinien zu, vor allem die CD4⁺DCs zeigten eine sehr hohe BrdU-Einbaurate drei Tage nach Infektion. Kamath et al. beobachteten nach Applikation von LPS *in vivo* eine Verkürzung der Halbwertszeit aller DCs in der Milz. Durch die gleichzeitige Abnahme der CD4⁺DCs nach LPS Applikationen, wurde vermutet, dass LPS Zelltod in CD4⁺DCs induziert [185]. Die Anzahl der toten DCs nimmt bei einer Infektion mit Ye leicht zu, aber erklärt allein nicht den extremen Verlust der DCs *in vivo*. Die leicht erhöhte Zelltodrate der CD4⁺DCs kann zum Teil durch die Zunahme der Proliferationsrate aufgrund der Infektion mit Ye erklärt werden. Es stellte sich somit die Frage, ob eine Infektion mit Yersinien die Rekrutierung oder Ausreifung der DC-Subpopulationen hemmt, wenn die Proliferation während der Infektion erhöht ist, aber die DCs dennoch extrem abnehmen. Für diese Fragestellung wurden transgene CD11c.DOG Mäuse verwendet, bei denen der Diphtherie-Toxinrezeptor unter der Kontrolle des CD11c Promoters exprimiert wird [158]. Durch die einmalige intraperitoneale Applikation von Diphtherie-Toxin sterben die DCs durch Apoptose. Alle drei DC-Subpopulationen von Kontrollmäusen sind vier Tage nach Diphtherie-Toxin Applikation in der Milz wieder auf ihrem Ausgangswert. CD4⁺DCs bzw. CD8 α ⁺DCs zeigen jedoch im Verlauf der Infektion mit Ye eine beeinträchtigte bzw. verzögerte Rekrutierung in die Milz. Durch die Zunahme des Turnovers der DC-Subpopulationen und der Hemmung der Homeostase der CD4⁺DCs und CD8 α ⁺DCs im Verlauf einer Infektion mit DCs kommt es zu dem Verlust dieser DC-Subpopulationen. Diese Aussage wird durch die zunehmende Anzahl der DN DCs nach Infektion mit Ye verstärkt. Der Turnover der DN DCs nimmt zu, und die DN DCs rekrutieren ohne Hemmung durch Ye in die Milz. Das deutet daraufhin, dass die beiden DC-Subpopulationen bzw. die DC-Vorläuferzellen durch Ye gehemmt werden und somit neue CD4⁺DCs und CD8 α ⁺DCs die Milz nicht erreichen. In den letzten Jahren wurde vermehrt am Ursprung und an der Entwicklung der DCs geforscht. Wobei dies bisher nur im steady state untersucht wurde und nicht bei Infektionen. Wie in Kapitel 1.1.3

beschrieben, stammen DCs von den Hämatopoetischen Stammzellen (HSC) im Knochenmark ab, aus denen die „macrophages and DCs precursor“ (MDPs) hervorgehen. Diese differenzieren sich zu den Monozyten und zu den „common DC precursor“ (CDPs). CDPs entwickeln sich zu pre-cDCs, die aus dem Knochenmark ins Blut migrieren, dort zirkulieren und in die lymphatischen Gewebe einwandern, um sich zu cDCs zu differenzieren [7,10-13]. In dieser Arbeit wurden die MDPs/CDPs im Knochenmark 24 h bis drei Tage nach Infektion mit Ye untersucht. Im Verlauf der Infektion nimmt die Anzahl der MDPs/CDPs ab, was durch verschiedene Faktoren induziert werden kann. Zum einen können die Bakterien die Hämatopoetischen Stammzellen hemmen, so dass sich keine MDPs/CDPs entwickeln können oder Ye induzieren Apoptose von MDPs/CDPs. Eine weitere Erklärung ist, dass die MDPs/CDPs sich zu den pre-cDCs differenzieren, um den Nachschub an benötigten DCs während der Infektion zu gewährleisten. Dabei würde es jedoch zu einer Akkumulation an pre-cDCs im Blut bzw. in der Milz kommen. Die Analyse der pre-cDCs im Blut und in der Milz im Verlauf der Infektion mit Ye führt jedoch nicht zu dem Ergebnis. Weder in der Milz noch im Blut konnte eine Anhäufung dieser Vorläuferzellen beobachtet werden. In der Milz steigt allerdings die Anzahl dieser Vorläuferzellen an. Die Erklärung hierfür ist, dass die Yersinien die Differenzierung von pre-cDCs zu cDCs hemmen und es somit zu dem massiven Verlust der CD4⁺DCs und CD8 α ⁺DCs kommt. Interessanterweise konnte keine Zunahme an MDPs/CDPs im Knochenmark und pre-cDCs im Blut und Milz bei Yersinien-infizierten Mäusen gefunden werden, bei denen der TRIF-Signalweg ausgeschaltet ist. Wahrscheinlicher ist, dass ein weiterer Faktor durch Ye gehemmt wird, der die Anzahl der DCs in der Milz reguliert. Im steady state wird die Teilung der DCs in den lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben durch Lymphotoxin- β Rezeptor (LT β R) und Flt3 reguliert. Flt3 Ligand (Flt3L) ist ein entscheidender Regulator in der DC Homeostase, der für alle DC-Entwicklungsstufen essentiell ist [18,19,166,186-188], wohingegen die Wirkung von LT α 1 β 2 anscheinend auf die CD8 α DCs in der Milz beschränkt ist [163]. Die genetische Deletion der Flt3L-Sequenz oder die Applikation von Flt3L-Inhibitoren führen zu einer zehnfachen Abnahme an DCs in den lymphatischen Geweben von Mäusen [187], wohingegen die zusätzliche Applikation von Flt3L eine extremen Expansion von DCs zeigt [166,189]. Analysen von Flt3L-Menge im Serum von Yersinien-infizierten C57BL/6 Mäusen zeigten, dass die Ausschüttung von Flt3L 24 h nach Infektion massiv anstieg und ab dem 2. Tag nach

Infektion wieder abnahm. Ähnliche Ergebnisse der Flt3L-Menge konnten in TRIF^{-/-}-Mäusen beobachtet werden. Yersinien hemmen die Teilung bzw. Differenzierung der DCs in der, die zu dem DCs Verlust führen, nicht über die Ausschüttung von Flt3L. Die erfolgreiche Entwicklung und Anzahl der DCs hängt von vielen Faktoren ab. Das Schicksal von einigen DC-Entwicklungsstufen hängt zusätzlich von wesentlichen Transkriptionsfaktoren ab. Den myeloiden Transkriptionsfaktor PU.1 benötigen die frühen Vorläuferzellen für ihre Entwicklung [190]. Außerdem reguliert PU.1 die Differenzierung der MDPs in Monozyten und CDPs. Bei Hemmung von PU.1 nehmen die MDPs im Knochenmark und die cDC *in vivo* ab [6,191,192]. Die Interferon-regulierenden Transkriptionsfaktoren Irf2, Irf8 und Irf4 werden als entscheidende Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung der DC-Subpopulationen beschrieben. Irf-4- und Irf-2-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte Anzahl von CD8 α ⁺DCs und Irf-8-defiziente Mäuse haben weniger CD8 α ⁺DCs [193-195]. Trotz der großen Fortschritte in der Analyse der Entwicklung der DCs bleiben entscheidende Punkte ungelöst. Vor allem, welche Signale und/oder Faktoren für die DC-Funktion und -Entwicklung allgemein durch Bakterien gehemmt werden. Zudem sind bisher die unterschiedlichen Faktoren, die jeweils für die Entwicklung der CD4⁺DCs und DN DCs noch nicht bekannt. Es könnte sein, dass diese Faktoren, die zur Ausdifferenzierung der CD4⁺DCs notwendig sind, durch die Infektion mit Ye gehemmt werden und somit zum Verlust führen. Dies wären die nächsten Schritte, um zu erfahren, wie Ye der Immunabwehr durch DCs entgeht. Außerdem sollte die Interaktion der T-Zellen mit Ye überprüft werden. Es ist bisher *in vivo* nicht untersucht worden, ob und wie Ye die T-Zellen direkt hemmt. Es ist bekannt, dass CD4⁺T-Zellen bei einer *Helicobacter pylori* Infektion durch ein Protein (gamma-Glutamyltranspeptidase = GGT) direkt gehemmt werden [196]. Außerdem sollte der natürliche Infektionsverlauf untersucht werden. Eine Infektion mit Ye erfolgt größtenteils durch die orale Aufnahme in die Peyerschen Plaques. Dort vermehren sie sich und migrieren in die mesenterialen Lymphknoten, Milz und Leber. Daher sollten die DCs auf ihre immunologischen Funktionen in den Peyerschen Plaques und im Dünndarm nach Infektion mit Ye *in vivo* untersucht werden.

Zusammenfassend konnte in diesem Projektteil gezeigt werden, dass Ye die DC-Subpopulationen unterschiedlich in ihrer Entwicklung und Funktion *in vivo* hemmt, um die Aktivierung der T-Zellen zu beeinträchtigen und somit der Immunabwehr zu entkommen. Die Infektion mit Ye führt zu einem extremen Verlust von CD4⁺DCs und

CD8 α ⁺DCs, der von TLR4 und TRIF abhängig ist. Dieser Verlust kann durch die erhöhte Turnoverrate der DCs, die leicht erhöhte Anzahl von nekrotischen und apoptotischen DCs, die Hemmung bzw Verzögerung von sich neu differenzierten DCs, sowie der Hemmung der DC-Vorläuferzellen erklärt werde (Abb.62).

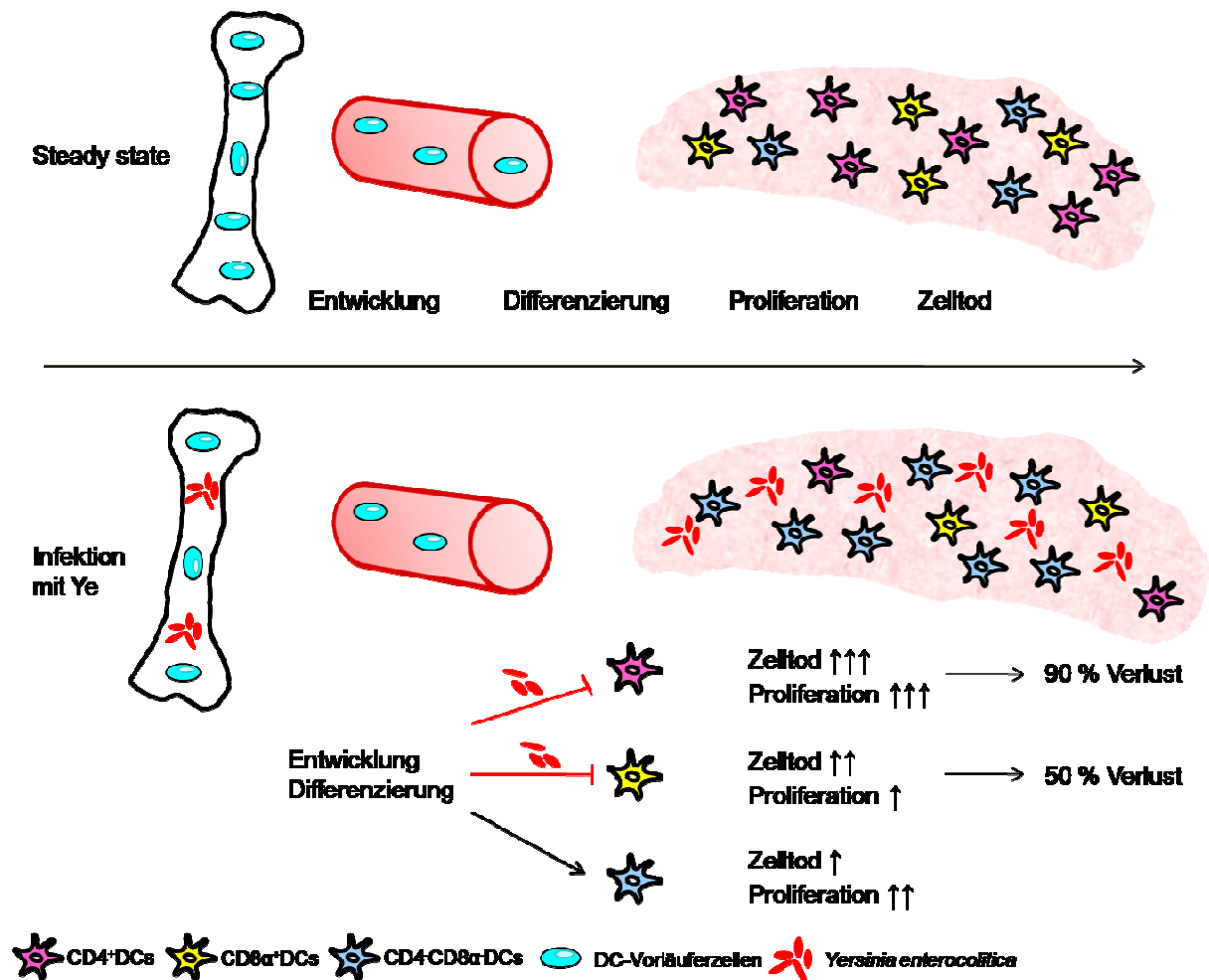


Abb. 62: Einfluß von Ye auf die Entwicklung, Differenzierung, Zelltod und Proliferation der DC-Subpopulationen während der Infektion *in vivo*

5.2 YopP beeinflusst die Funktion der DC-Subpopulationen

Yersinia enterocolitica ist durch seine verschiedenen Pathogenitätsfaktoren in der Lage, das Immunsystem bei einer Infektion zu beeinflussen, um sein Überleben im Wirt abzusichern. Yersinia outer proteins (Yops) gelten als zentralen Pathogenitätsfaktoren, die auf einem 70 kb großen Plasmid (plasmid yersinia virulence = pYV) kodiert sind. Neben den sogenannten Yops kodiert das Plasmid das Typ-III-Sekretionssystem, das verantwortlich ist, für die Translokation der Yops in die Wirtszelle. Es gibt sechs verschiedene Yop-Effektorproteine, die an verschiedene Targets in der Wirtszelle ansetzen. YopT, YopO, YopH und YopE interagieren mit dem Zytoskelett und hemmen dadurch die Funktion von Phagozyten [74,197,198]. Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor von Ye ist YopP. YopP ist eine Cytein-Protease, die nach der Translokation durch das Typ-III-Sekretionssystem, verschiedene Funktionen des Immunsystems hemmt. T-Zell-Proliferationsanalysen mit Ye-infizierten DCs *in vitro* zeigten, dass die Aktivierung der T-Zellen vollständig gehemmt wurde. Wohingegen die T-Zellaktivierung wieder hergestellt war mit DCs, die mit YopP-defizienten Ye infiziert wurden [136,168].

In einem ersten Schritt sollte deshalb untersucht werden, ob YopP die Aktivierung der CD4⁺T-Zellen durch DCs *in vivo* verhindert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die T-Zellaktivierung *in vivo* zunahm, wenn die Mäuse mit der Ye pYV YopP⁻ defizienten Mutante im Vergleich zu den Mäusen, die mit Ye pYV⁺ Wildtypstamm infiziert wurden. Diese Daten lassen darauf schließen, dass YopP eine hemmende Wirkung bei der T-Zellaktivierung durch DCs während einer Infektion mit Ye besitzt. Da die T-Zellproliferation auch bei Infektion mit der YopP-defizienten Mutante nicht vollständig hergestellt ist, werden wahrscheinlich neben YopP weitere Yops die T-Zellaktivierung direkt oder durch DCs hemmen. Es ist bekannt, dass YopH die Aktivierung von T- und B-Zellen, durch die Hemmung der Phosphorylierung des Antigenrezeptor-Signal-Komplexes der T-Zellen, beeinträchtigt [199]. Interessanterweise hat YopP auch Einfluß auf die Aktivierung von CD8⁺T-Zellen. Infektionsversuche mit der YopP-Deletionsmutante zeigten ebenfalls eine höhere Aktivierung von CD8⁺T-Zellen im Vergleich zu den Ye pYV⁺-infizierten Mäusen [132]. YopP hemmt vor allem die Ausbildung der adaptiven Immunabwehr, was wahrscheinlich durch Hemmung der Antigenpräsentation der DCs geschieht [132,200]. *In vitro* Experimente zeigten, dass die Antigenaufnahme von DCs durch

Ye gehemmt wird. Die Antigenaufnahme wird durch Clathrin-vermittelte Endozytose durch YopP und die Makropinozytose durch die Yops E, O, H und T über die Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts der Wirtszelle gehemmt [128,136]. In dieser Arbeit konnte eine Abnahme der Antigenaufnahme in CD8 α ⁺DCs aus der Milz von Yersinien-infizierten Mäusen *in vivo* beobachtet werden. Im Vergleich zu den Ye pYV⁺-infizierten Mäusen war diese Abnahme bei CD8 α ⁺DCs nach Infektion mit der Ye YopP-defizienten Mutante nicht mehr so ausgeprägt. Somit konnten die Daten aus *in vitro* Experimenten bestätigt werden, dass YopP die Antigenaufnahme durch DCs hemmt. Die Autoren fanden dabei heraus, dass YopP die Antigenaufnahme durch die Inhibition des MAPK Signaltransduktionsweges beeinträchtigt [136]. Diese hier gewonnenen Ergebnisse demonstrieren, dass YopP die Antigenaufnahme von CD8 α ⁺DCs hemmt, jedoch auch hier weitere Faktoren von Ye die Antigenaufnahme beeinflussen. Einen Einfluß von YopP auf die Antigenprozessierung konnte jedoch nicht ermittelt werden.

Erfurt et al. konnten in *in vitro* Experimenten außerdem nachweisen, dass YopP die DC-Maturation und die Zytokinproduktion beeinflusst. Dabei wurde gezeigt, dass die Infektion von Knochenmark-DCs mit dem Ye Wildtypstamm zu einer Abnahme der Expression von MHC-II, CD54, CD80 und CD86 führt und dieser Effekt durch YopP verursacht wird [136]. Die Produktion der Zytokine KC, TNF- α , IL-10 und IL-12 durch DCs, Makrophagen und Epithelzellen wird ebenfalls durch YopP beeinträchtigt [136,201]. In dieser Arbeit konnte *in vivo* gezeigt werden, dass YopP die Expression von MHC-II, CD80 und CD86 auf allen DC-Subpopulationen im frühen Verlauf der Infektion (24 h nach Infektion) induziert und drei Tage nach Infektion hemmt, vor allem die Oberflächenmarker CD80 und CD86 auf CD8 α ⁺DCs und DN DCs. Die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-12 und IL-6 durch die DC-Subpopulationen zeigten eine Abnahme bei Infektion mit der Ye YopP-defizienten Mutante. Das deutet daraufhin, dass YopP die Zytokinproduktion *in vivo* induziert statt hemmt wie *in vitro* ermittelt wurde. Es ist bekannt, dass die frühe TNF α -Ausschüttung als Antwort auf bakterielle Infektionen direkt die Apoptose von Immunzellen auslösen kann [202-205]. Zudem konnten eine Vielzahl von Gruppen *in vitro* zeigen, dass YopP durch Apoptose in Makrophagen und DCs die Immunantwort des Wirtes unterdrücken [130,131,136,140,206], indem YopP die Aktivierung von NF- κ B blockiert [131]. In Projekt 1 konnte nach der Analyse der Zellanzahl während der Infektion mit Ye ein extremer Verlust von CD4⁺DCs und CD8 α ⁺DCs beobachtet

werden. Bei der Infektion mit der Ye YopP-defizienten Mutante konnte hier ein verzögerter Verlust dieser DC-Subpopulationen 24 h nach Infektion im Vergleich mit dem Ye Wildtypstamm *in vivo* ermittelt werden. Somit ist YopP für den frühen Verlust der beiden DC-Subpopulationen verantwortlich, jedoch nicht ausschlaggebend. Die Analyse der nekrotischen DC-Subpopulationen *in vivo* zeigte, dass YopP drei Tage nach Infektion einen Einfluß auf den Zelltod von CD4⁺DCs und DN DCs besitzt. Ebenfalls konnte ein Einfluß auf die Apoptose durch YopP ermittelt werden. Bei Fehlen des Pathogenitätsfaktors waren weniger apoptotische DN DCs (1dpi), CD4⁺DCs (3dpi) und CD8 α ⁺DCs (3dpi) in der Milz zu detektieren. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass YopP Zelltod und Apoptose der DC-Subpopulationen in der frühen Immunantwort verzögert induziert. Der sehr schnelle und extrem hohe Zelltod von DCs, wie *in vitro* bei Infektion von Knochenmark-DCs durch YopP konnte *in vivo* nicht vollständig bestätigt werden [128,129,136]. Rueckdeschel et al. fanden, dass das Myd88-Adaptormolekül zum YopP-abhängigen Zelltod bzw. zur Apoptose von Makrophagen beiträgt [207]. Aus diesem Grund wurden die DC-Subpopulationen in der Milz von Myd88^{-/-}Mäuse auf Zelltod nach Infektion mit dem Ye Wildtypstamm und Ye YopP-defizienten Mutanten untersucht. Die Anzahl der CD4⁺DCs und CD8 α ⁺DCs lag deutlich niedriger in Myd88^{-/-}Mäuse nach Infektion mit der Ye YopP-defizienten Mutante im Vergleich zum Ye Wildtypstamm, dagegen nahmen die DN DCs deutlich zu. Eine Zunahme am Zelltod konnte in Myd88^{-/-}Mäusen bei CD4⁺DCs und DN DCs ermittelt werden. Die Beobachtungen lassen darauf schließen, dass YopP für den Zelltod von CD4⁺DC verantwortlich ist, der abhängig von MyD88-Signalweg ist. Jedoch deutet es auch daraufhin, dass es einen weiteren Signalweg gibt, der unabhängig vom MyD88-Weg Zelltod induziert, da bei den Infektionen von MyD88^{-/-}Mäusen mit der YopP-defizienten Mutante der Zelltod ansteigt. Für den Zelltod in Makrophagen wird die Kombination von TLR4-vermitteltem LPS-Signal mit der gleichzeitigen Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch YopP verantwortlich gemacht [131]. Das könnte bedeuten, dass TLR4 nicht über MyD88-Signalweg weitergeleitet wird, sondern verzögert über den TRIF-Signalweg [207,208].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Pathogenitätsfaktor YopP die T-Zellaktivierung durch Hemmung verschiedener DC Funktionen *in vivo* beeinträchtigt. YopP hemmt vor allem die Antigenaufnahme der CD8 α ⁺DCs in der Milz und beeinflusst die Produktion der proinflammatorischen Zytokine, die für die T-

Zellaktivierung notwendig ist. Außerdem ist YopP an der Induktion von Nekrose und Apoptose von DCs mitbeteiligt, wobei YopP diese beiden Prozesse zeitlich unterschiedlich in den einzelnen DC-Subpopulationen induziert. Für die weitere Analyse wäre es wichtig, zu untersuchen welche weiteren Pathogenitätsfaktoren von *Y. e.* die Funktionen der DCs hemmen, um das Überleben im Wirt zu garantieren.

6 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DCs) sind als „professionelle“ antigenpräsentierende Zellen vor allem effizient in der Lage, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Die Expression von MHC-Peptid-Komplex und kostimulatorische Moleküle befähigen DCs zur Induktion einer Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort. Aufgrund dieser Eigenschaften sind DCs ein adäquates Ziel bakterieller Immunevasionsstrategien, um einer antibakteriellen Immunantwort entgegenzuwirken. Das darm-pathogene Bakterium *Yersinia enterocolitica* (Ye) hat immunmodulatorische Mechanismen mit Hilfe seiner Pathogenitätsfaktoren entwickelt, um dem Angriff durch das Immunsystem zu entgehen, um eine Infektion im Wirt zu etablieren.

In der vorliegenden Dissertation wurde das Ye-Mausmodell verwendet, um die Interaktion von DCs mit Bakterien zu untersuchen. Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass Ye die T-Zellantwort durch DCs *in vitro* vollständig hemmt. Dies erklärte sich daraus, dass Ye die Antigenaufnahme, Maturation und die Zytokinproduktion der DCs *in vitro* blockiert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Ye Nekrose und Apoptose in Knochenmark-DCs induziert. Darauf basierend wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht: (1) ob und welche Funktionen der DC-Subpopulationen durch Ye *in vivo* gehemmt werden (2) ob Ye Zelltod von DC-Subpopulationen induziert und ob die Entwicklung bzw. Rekrutierung neuer cDCs beeinträchtigt wird und (3) ob der Pathogenitätsfaktor YopP von Ye den hemmenden Effekt auf die Funktionen der DCs *in vitro* ebenfalls im Mausmodell bestätigt.

- (1) Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Ye die T-Zellaktivierung durch DCs, vor allem durch die CD8 α ⁺DCs, hemmt. Die Gründe für die reduzierte T-Zellproliferation zeigte sich in der Abnahme der Antigenaufnahme und Antigenprozessierung der CD8 α ⁺DCs im Verlauf der Infektion. Desweiteren führt die Infektion mit Ye zu einem extremen Verlust an CD4⁺DCs und CD8 α ⁺DCs in der Milz, abhängig vom TLR4- und TRIF-Signaltransduktionsweg.
- (2) Die Erklärung für die ausgeprägte Abnahme der CD4⁺DCs und CD8 α ⁺DCs in der Milz im Verlauf der Infektion konnte durch eine leicht erhöhte Zelltodrate mit gleichzeitig erhöhtem Turnover der DCs gezeigt werden. Zusätzlich beeinträchtigt Ye die Homeostase der spezifischen DC-Subpopulationen.

Dieser extreme DC-Verlust und die beeinträchtigte DC-Funktion führt letztendlich zur Abnahme der T-Zell-Aktivierung *in vivo*.

(3) In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Pathogenitätsfaktor YopP von *Ye* einen hemmenden Einfluss auf die T-Zellaktivierung *in vivo* besitzt, jedoch nicht als hauptverantwortlich identifiziert werden kann. Dieser hemmende Einfluss von YopP auf die T-Zell-Aktivierung ist die Folge der Beeinträchtigung der Antigenaufnahme der CD8 α^+ DCs. Zusätzlich induziert YopP die Maturation in der frühen Immunantwort, hemmt diese jedoch vor allem bei den CD8 α^+ DCs und den DN DCs drei Tage nach Infektion. Die Zytokinproduktion der DC-Subpopulationen wird durch YopP im frühen Verlauf induziert. Durch die hohe TNF- α -Ausschüttung und wahrscheinlich durch die Hemmung von NF- κ B trägt YopP zum Zelltod von CD4 $^+$ DCs in der Milz bei, welcher abhängig vom MyD88-Signaltransduktionsweg ist. Somit ist YopP ein wichtiger Pathogenitätsfaktor, der zur bakteriellen Immunevasion der DC-Subpopulationen beiträgt.

Die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Erkenntnisse über das Verhalten der cDCs innerhalb einer bakteriellen Infektion können einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Immunabwehr leisten und die Entwicklung neuer Therapiestrategien unterstützen.

7 Referenzen

1. Steinman, R. M. 1981. Dendritic cells. *Transplantation* 31:151.
2. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
3. Shortman, K., and Y. J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2:151.
4. Ardavin, C. 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3:582.
5. Yrlid, U., and M. J. Wick. 2002. Antigen presentation capacity and cytokine production by murine splenic dendritic cell subsets upon Salmonella encounter. *J. Immunol.* 169:108.
6. Merad, M., and M. G. Manz. 2009. Dendritic cell homeostasis. *Blood* 113:3418.
7. Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656.
8. Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu, and K. Shortman. 2000. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol.* 164:2978.
9. Alvarez, D., E. H. Vollmann, and U. H. von Andrian. 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity.* 29:325.
10. Fogg, D. K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano, and F. Geissmann. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311:83.
11. Liu, K., G. D. Victora, T. A. Schwickert, P. Guermonprez, M. M. Meredith, K. Yao, F. F. Chu, G. J. Randolph, A. Y. Rudensky, and M. Nussenzweig. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324:392.
12. Onai, N., A. Obata-Onai, M. A. Schmid, T. Ohteki, D. Jarrossay, and M. G. Manz. 2007. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.* 8:1207.
13. Naik, S. H., P. Sathe, H. Y. Park, D. Metcalf, A. I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O'Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J. Y. Kwak, L. Wu, and K. Shortman. 2007. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* 8:1217.

14. Liu, K., and M. C. Nussenzweig. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev.* 234:45.
15. Vremec, D., G. J. Lieschke, A. R. Dunn, L. Robb, D. Metcalf, and K. Shortman. 1997. The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 27:40.
16. Maraskovsky, E., E. Daro, E. Roux, M. Teepe, C. R. Maliszewski, J. Hoek, D. Caron, M. E. Lebsack, and H. J. McKenna. 2000. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 96:878.
17. Kabashima, K., T. A. Banks, K. M. Ansel, T. T. Lu, C. F. Ware, and J. G. Cyster. 2005. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity.* 22:439.
18. Waskow, C., K. Liu, G. rrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao, and M. Nussenzweig. 2008. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 9:676.
19. Darrasse-Jeze, G., S. Deroubaix, H. Mouquet, G. D. Victora, T. Eisenreich, K. H. Yao, R. F. Masilamani, M. L. Dustin, A. Rudensky, K. Liu, and M. C. Nussenzweig. 2009. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 206:1853.
20. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767.
21. Engering, A. J., M. Cella, D. Fluitsma, M. Brockhaus, E. C. Hoefsmit, A. Lanzavecchia, and J. Pieters. 1997. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27:2417.
22. Reis e Sousa, P. D. Stahl, and J. M. Austyn. 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* 178:509.
23. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389.
24. Austyn, J. M. 1996. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 183:1287.
25. Steinman, R. M., and J. Swanson. 1995. The endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 182:283.
26. Watts, C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 15:821.

27. Jiang, W., W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375:151.
28. Kloetzel, P. M. 2004. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim. Biophys. Acta* 1695:225.
29. Kloetzel, P. M. 2004. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat. Immunol.* 5:661.
30. Lehner, P. J., and P. Cresswell. 1996. Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 8:59.
31. Mellman, I., and R. M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255.
32. Turley, S. J., K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman, and I. Mellman. 2000. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288:522.
33. Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19:47.
34. Trombetta, E. S., M. Ebersold, W. Garrett, M. Pypaert, and I. Mellman. 2003. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299:1400.
35. Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5:987.
36. Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 11:115.
37. Kawai, T., and S. Akira. 2006. TLR signaling. *Cell Death. Differ.* 13:816.
38. Takeda, K. 2005. [Toll-like receptor]. *Nihon Rinsho Meneki. Gakkai Kaishi* 28:309.
39. Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17:1.
40. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290:92.
41. Liu, Y. J., H. Kanzler, V. Soumelis, and M. Gilliet. 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol.* 2:585.
42. Pierre, P., S. J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R. M. Steinman, and I. Mellman. 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388:787.

43. Zinkernagel, R. M. 1974. Restriction by H-2 gene complex of transfer of cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes*. *Nature* 251:230.
44. Perrin, P. J., T. A. Davis, D. S. Smoot, R. Abe, C. H. June, and K. P. Lee. 1997. Mitogenic stimulation of T cells reveals differing contributions for B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulation. *Immunology* 90:534.
45. Freeman, G. J., G. S. Gray, C. D. Gimmi, D. B. Lombard, L. J. Zhou, M. White, J. D. Fingerth, J. G. Gribben, and L. M. Nadler. 1991. Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 174:625.
46. Gimmi, C. D., G. J. Freeman, J. G. Gribben, K. Sugita, A. S. Freedman, C. Morimoto, and L. M. Nadler. 1991. B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:6575.
47. Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, M. Azuma, K. Okumura, L. L. Lanier, and J. Banchereau. 1994. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 180:1841.
48. Gimmi, C. D., G. J. Freeman, J. G. Gribben, G. Gray, and L. M. Nadler. 1993. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:6586.
49. Haring, J. S., V. P. Badovinac, and J. T. Harty. 2006. Inflaming the CD8+ T cell response. *Immunity*. 25:19.
50. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145.
51. Seder, R. A., R. N. Germain, P. S. Linsley, and W. E. Paul. 1994. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. *J. Exp. Med.* 179:299.
52. Jelley-Gibbs, D. M., T. M. Strutt, K. K. McKinstry, and S. L. Swain. 2008. Influencing the fates of CD4 T cells on the path to memory: lessons from influenza. *Immunol. Cell Biol.* 86:343.
53. Mosmann, T. R., and S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17:138.
54. Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky, and C. R. Maliszewski. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:1036.
55. Maldonado-Lopez, R., S. T. De, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189:587.

56. Pooley, J. L., W. R. Heath, and K. Shortman. 2001. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J. Immunol.* 166:5327.
57. Stockinger, B., C. Bourgeois, and G. Kassiotis. 2006. CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis. *Immunol. Rev.* 211:39.
58. Zheng, Y., P. A. Valdez, D. M. Danilenko, Y. Hu, S. M. Sa, Q. Gong, A. R. Abbas, Z. Modrusan, N. Ghilardi, F. J. de Sauvage, and W. Ouyang. 2008. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* 14:282.
59. Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, and T. Nomura. 2006. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 212:8.
60. Chtanova, T., S. G. Tangye, R. Newton, N. Frank, M. R. Hodge, M. S. Rolph, and C. R. Mackay. 2004. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J. Immunol.* 173:68.
61. Bottone, E. J. 1999. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes. Infect.* 1:323.
62. Brenner, D. J. 1979. Speciation in *Yersinia*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 5:33.
63. Frederiksen, and W. 1964. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria, "Bacterium enterocoliticum" and "Pasteurella X". Proc. XIVth Scand. Congr. Pathol. Microbiol. Oslo.
64. Achtman, M., K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel. 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:14043.
65. Heesemann, J. 1994. Die Gattung *Yersinia*. In: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie; Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York
66. Bockemühl, J, and Wong JD. 2003. *Yersinia*. In: Murray PR, ed. Manual of clinical microbiology, 8th edn. ASM Press, Washington, DC, pp. 672.
67. Aepfelbacher, M., and J. Heesemann. 2001. Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by *Yersinia* outer proteins (Yops). *Int. J. Med. Microbiol.* 291:269.
68. Wauters, G., K. Kandolo, and M. Janssens. 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 9:14.
69. Zheng, X. B., and C. Xie. 1996. Note: isolation, characterization and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* from humans and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 81:681.

70. Cornelis, G. R. 1994. Yersinia pathogenicity factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 192:243.
71. Heesemann, J., C. Keller, R. Morawa, N. Schmidt, H. J. Siemens, and R. Laufs. 1983. Plasmids of human strains of Yersinia enterocolitica: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 147:107.
72. Black, R. E., R. J. Jackson, T. Tsai, M. Medvesky, M. Shayegani, J. C. Feeley, K. I. MacLeod, and A. M. Wakelee. 1978. Epidemic Yersinia enterocolitica infection due to contaminated chocolate milk. *N. Engl. J. Med.* 298:76.
73. Cover, T. L., and R. C. Aber. 1989. Yersinia enterocolitica. *N. Engl. J. Med.* 321:16.
74. Bockemuhl, J., and P. Roggentin. 2004. [Intestinal yersiniosis. Clinical importance, epidemiology, diagnosis, and prevention]. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz.* 47:685.
75. Shayegani, M., I. DeForge, D. M. McGlynn, and T. Root. 1981. Characteristics of Yersinia enterocolitica and related species isolated from human, animal, and environmental sources. *J. Clin. Microbiol.* 14:304.
76. Bottone, E. J. 1997. Yersinia enterocolitica: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:257.
77. Hoogkamp-Korstanje, J. A., and K. J. de. 1990. [Clinical aspects, diagnosis and therapy of Yersinia enterocolitica infections]. *Immun. Infekt.* 18:192.
78. Dedié K, B. J. K. H. e. al. 1993. Bakterielle Zoonosen. Tier und Mensch. Enke, Stuttgart, pp. 377.
79. Dequeker, J., R. Jamar, and M. Walravens. 1980. HLA-B27, arthritis and Yersinia enterocolitica infection. *J. Rheumatol.* 7:706.
80. Schiemann, D. A. 1979. Synthesis of a selective agar medium for Yersinia enterocolitica. *Can. J. Microbiol.* 25:1298.
81. Goverde, R. L. J. 1999. Yersinia enterocolitica: genes involved in cold-adaptation. University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands.
82. Pepe, J. C., J. L. Badger, and V. L. Miller. 1994. Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the Yersinia enterocolitica inv gene. *Mol. Microbiol.* 11:123.
83. Grutzkau, A., C. Hanski, H. Hahn, and E. O. Riecken. 1990. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by Yersinia enterocolitica and other enteroinvasive bacteria. *Gut* 31:1011.
84. Heesemann, J., U. Gross, and L. Gruter. 1987. Genetic manipulation of virulence of Yersinia enterocolitica. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 9:312.

85. Clark, M. A., B. H. Hirst, and M. A. Jepson. 1998. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect. Immun.* 66:1237.
86. Yang, Y., and R. R. Isberg. 1993. Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis* yadA product. *Infect. Immun.* 61:3907.
87. Bliska, J. B., M. C. Copass, and S. Falkow. 1993. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEP-2 cells. *Infect. Immun.* 61:3914.
88. Miller, V. L., J. J. Farmer, III, W. E. Hill, and S. Falkow. 1989. The ail locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect. Immun.* 57:121.
89. Autenrieth, I. B., and R. Firsching. 1996. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J. Med. Microbiol.* 44:285.
90. Ghosh, P. 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:771.
91. Cornelis, G. R. 2002. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.* 158:401.
92. Cornelis, G. R. 2002. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:742.
93. Navarro, L., N. M. Alto, and J. E. Dixon. 2005. Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:21.
94. Viboud, G. I., and J. B. Bliska. 2005. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:69.
95. Guan, K. L., and J. E. Dixon. 1990. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 249:553.
96. Bruckner, S., S. Rhamouni, L. Tautz, J. B. Denault, A. Alonso, B. Becattini, G. S. Salvesen, and T. Mustelin. 2005. *Yersinia* phosphatase induces mitochondrially dependent apoptosis of T cells. *J. Biol. Chem.* 280:10388.
97. Trulzsch, K., T. Sporleder, E. I. Igwe, H. Russmann, and J. Heesemann. 2004. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect. Immun.* 72:5227.
98. Aepfelbacher, M. 2004. Modulation of Rho GTPases by type III secretion system translocated effectors of *Yersinia*. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* 152:65.

99. Shao, F., and J. E. Dixon. 2003. YopT is a cysteine protease cleaving Rho family GTPases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 529:79.
100. Benabdillah, R., L. J. Mota, S. Lutzelschwab, E. Demoinet, and G. R. Cornelis. 2004. Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp. *Microb. Pathog.* 36:247.
101. Leung, K. Y., B. S. Reisner, and S. C. Straley. 1990. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect. Immun.* 58:3262.
102. Aepfelbacher, M., C. Trasak, and K. Ruckdeschel. 2007. Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thromb. Haemost.* 98:521.
103. Koberle, M., A. Klein-Gunther, M. Schutz, M. Fritz, S. Berchtold, E. Tolosa, I. B. Autenrieth, and E. Bohn. 2009. *Yersinia enterocolitica* targets cells of the innate and adaptive immune system by injection of Yops in a mouse infection model. *PLoS. Pathog.* 5: 551.
104. Autenrieth S.E., Linzer T.-R., Hiller C., Keller B., Warnke P., Koeberle M., Bohn E., Biedermann T., Buehring H.-J., Haemmerling G.J., Rammensee H.-G., and Autenrieth I.B. 2010. Immune evasion by *Yersinia enterocolitica*: differential targeting of dendritic cell subpopulation. *PloS pathogens*.
105. Marketon, M. M., R. W. DePaolo, K. L. DeBord, B. Jabri, and O. Schneewind. 2005. Plague bacteria target immune cells during infection. *Science* 309:1739.
106. Autenrieth, I. B., U. Vogel, S. Preger, B. Heymer, and J. Heesemann. 1993. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T-cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. *Infect. Immun.* 61:2585.
107. Autenrieth, I. B., P. Hantschmann, B. Heymer, and J. Heesemann. 1993. Immunohistological characterization of the cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes. *Immunobiology* 187:1.
108. Autenrieth, I. B., A. Tingle, A. Reske-Kunz, and J. Heesemann. 1992. T lymphocytes mediate protection against *Yersinia enterocolitica* in mice: characterization of murine T-cell clones specific for *Y. enterocolitica*. *Infect. Immun.* 60:1140.
109. Bohn, E., and I. B. Autenrieth. 1996. IL-12 is essential for resistance against *Yersinia enterocolitica* by triggering IFN-gamma production in NK cells and CD4+ T cells. *J. Immunol.* 156:1458.
110. Bohn, E., A. Sing, R. Zumbihl, C. Bielfeldt, H. Okamura, M. Kurimoto, J. Heesemann, and I. B. Autenrieth. 1998. IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. *J. Immunol.* 160:299.

111. Bliska, J. B., and S. Falkow. 1992. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:3561.
112. Miller, V. L., and S. Falkow. 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* 56:1242.
113. Isberg, R. R., and J. M. Leong. 1990. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60:861.
114. Kampik, D., R. Schulte, and I. B. Autenrieth. 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections. *Infect. Immun.* 68:2484.
115. Pepe, J. C., and V. L. Miller. 1993. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:6473.
116. Iriarte, M., J. C. Vanooteghem, I. Delor, R. Diaz, S. Knutton, and G. R. Cornelis. 1993. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 9:507.
117. Delor, I., and G. R. Cornelis. 1992. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect. Immun.* 60:4269.
118. Autenrieth, I. B., R. Reissbrodt, E. Saken, R. Berner, U. Vogel, W. Rabsch, and J. Heesemann. 1994. Desferrioxamine-promoted virulence of *Yersinia enterocolitica* in mice depends on both desferrioxamine type and mouse strain. *J. Infect. Dis.* 169:562.
119. Autenrieth, I. B., E. Bohn, J. H. Ewald, and J. Heesemann. 1995. Deferoxamine B but not deferoxamine G1 inhibits cytokine production in murine bone marrow macrophages. *J. Infect. Dis.* 172:490.
120. Aili, M., E. L. Isaksson, B. Hallberg, H. Wolf-Watz, and R. Rosqvist. 2006. Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Cell Microbiol.* 8:1020.
121. Andor, A., K. Trulzsch, M. Essler, A. Roggenkamp, A. Wiedemann, J. Heesemann, and M. Aepfelbacher. 2001. YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol.* 3:301.
122. Rosqvist, R., K. E. Magnusson, and H. Wolf-Watz. 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* 13:964.

123. Lee, V. T., C. Tam, and O. Schneewind. 2000. LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 275:36869.
124. Sarker, M. R., C. Neyt, I. Stainier, and G. R. Cornelis. 1998. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J. Bacteriol.* 180:1207.
125. Hines, J., E. Skrzypek, A. V. Kajava, and S. C. Straley. 2001. Structure-function analysis of *Yersinia pestis* YopM's interaction with alpha-thrombin to rule on its significance in systemic plague and to model YopM's mechanism of binding host proteins. *Microb. Pathog.* 30:193.
126. Trasak, C., G. Zenner, A. Vogel, G. Yuksekdog, R. Rost, I. Haase, M. Fischer, L. Israel, A. Imhof, S. Linder, M. Schleicher, and M. Aepfelbacher. 2007. *Yersinia* protein kinase YopO is activated by a novel G-actin binding process. *J. Biol. Chem.* 282:2268.
127. Adkins, I., M. Koberle, S. Grobner, S. E. Autenrieth, E. Bohn, S. Borgmann, and I. B. Autenrieth. 2008. *Y. enterocolitica* inhibits antigen degradation in dendritic cells. *Microbes. Infect.* 10:798.
128. Grobner, S., S. E. Autenrieth, I. Soldanova, D. S. Gunst, M. Schaller, E. Bohn, S. Muller, M. Leverkus, S. Wesselborg, I. B. Autenrieth, and S. Borgmann. 2006. *Yersinia* YopP-induced apoptotic cell death in murine dendritic cells is partially independent from action of caspases and exhibits necrosis-like features. *Apoptosis.* 11:1959.
129. Grobner, S., S. Schulz, I. Soldanova, D. S. Gunst, M. Waibel, S. Wesselborg, S. Borgmann, and I. B. Autenrieth. 2007. Absence of Toll-like receptor 4 signaling results in delayed *Yersinia enterocolitica* YopP-induced cell death of dendritic cells. *Infect. Immun.* 75:512.
130. Monack, D. M., J. Meccas, D. Bouley, and S. Falkow. 1998. *Yersinia*-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. *J. Exp. Med.* 188:2127.
131. Ruckdeschel, K., O. Mannel, K. Richter, C. A. Jacobi, K. Trulzsch, B. Rouot, and J. Heesemann. 2001. *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J. Immunol.* 166:1823.
132. Trulzsch, K., G. Geginat, T. Sporleder, K. Ruckdeschel, R. Hoffmann, J. Heesemann, and H. Russmann. 2005. *Yersinia* outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. *J. Immunol.* 174:4244.
133. China, B., M. P. Sory, B. T. N'Guyen, B. M. De, and G. R. Cornelis. 1993. Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect. Immun.* 61:3129.

134. Roggenkamp, A., N. Ackermann, C. A. Jacobi, K. Truelzsch, H. Hoffmann, and J. Heesemann. 2003. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J. Bacteriol.* 185:3735.
135. Orth, K. 2002. Function of the *Yersinia* effector YopJ. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:38.
136. Erfurth, S. E., S. Grobner, U. Kramer, D. S. Gunst, I. Soldanova, M. Schaller, I. B. Autenrieth, and S. Borgmann. 2004. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect. Immun.* 72:7045.
137. Zhang, Y., and J. B. Bliska. 2005. Role of macrophage apoptosis in the pathogenesis of *Yersinia*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 289:151.
138. Orth, K., L. E. Palmer, Z. Q. Bao, S. Stewart, A. E. Rudolph, J. B. Bliska, and J. E. Dixon. 1999. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science* 285:1920.
139. Zhou, H., D. M. Monack, N. Kayagaki, I. Wertz, J. Yin, B. Wolf, and V. M. Dixit. 2005. *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation. *J. Exp. Med.* 202:1327.
140. Denecker, G., W. Declercq, C. A. Geuijen, A. Boland, R. Benabdillah, G. M. van, M. P. Sory, P. Vandenabeele, and G. R. Cornelis. 2001. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *J. Biol. Chem.* 276:19706.
141. De, T. C., B. Pajak, M. Brait, N. Glaichenhaus, J. Urbain, M. Moser, G. Lauvau, and E. Muraille. 2005. TLR4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter-inducing IFN-beta, but not MyD88, regulate *Escherichia coli*-induced dendritic cell maturation and apoptosis in vivo. *J. Immunol.* 175:839.
142. Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2:361.
143. Sundquist, M., and M. J. Wick. 2009. *Salmonella* induces death of CD8alpha(+) dendritic cells but not CD11c(int)CD11b(+) inflammatory cells in vivo via MyD88 and TNFR1. *J. Leukoc. Biol.* 85:225.
144. Wick, M. J. 2002. The role of dendritic cells during *Salmonella* infection. *Curr. Opin. Immunol.* 14:437.
145. Wick, M. J. 2007. Monocyte and dendritic cell recruitment and activation during oral *Salmonella* infection. *Immunol. Lett.* 112:68.
146. Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabet, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, and B. Beutler. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743.

147. Robertson, J. M., P. E. Jensen, and B. D. Evavold. 2000. DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J. Immunol.* 164:4706.
148. Heesemann, J., and R. Laufs. 1983. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J. Bacteriol.* 155:761.
149. Heesemann, J., C. Keller, R. Morawa, N. Schmidt, H. J. Siemens, and R. Laufs. 1983. Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 147:107.
150. Maecker, H., and J. Trooter. 2008. Selecting reagents for multicolor flow cytometry. BD biosciences.
151. Dean, N. P., and R. A. Hoffman. 1997. Overview of Flow Cytometry Instrumentation. *Current Protocols in Cytometry*; John Wiley and Sons, Inc.
152. Klausner, R. D., J. G. Donaldson, and J. Lippincott-Schwartz. 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116:1071.
153. Weston, S. A., and C. R. Parish. 1990. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J. Immunol. Methods* 133:87.
154. Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239.
155. Fischer, U., R. U. Janicke, and K. Schulze-Osthoff. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death. Differ.* 10:76.
156. Salvesen, G. S. 2002. Caspases and apoptosis. *Essays Biochem.* 38:9.
157. Gratzner, H. G. 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474.
158. Hochweller, K., J. Striegler, G. J. Hammerling, and N. Garbi. 2008. A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 38:2776.
159. Quah, B. J., H. S. Warren, and C. R. Parish. 2007. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat. Protoc.* 2:2049.
160. Wells, A. D., H. Gudmundsdottir, and L. A. Turka. 1997. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J. Clin. Invest* 100:3173.

161. De, S. T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, B. P. De, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J. Exp. Med.* 184:1413.
162. Wadkins, R. M., and T. M. Jovin. 1991. Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. *Biochemistry* 30:9469.
163. Kamath, A. T., S. Henri, F. Battye, D. F. Tough, and K. Shortman. 2002. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100:1734.
164. Lyman, S. D. 1995. Biology of flt3 ligand and receptor. *Int. J. Hematol.* 62:63.
165. Karsunky, H., M. Merad, A. Cozzio, I. L. Weissman, and M. G. Manz. 2003. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 198:305.
166. Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman, and H. J. McKenna. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* 184:1953.
167. Adkins, I., M. Koberle, S. Grobner, E. Bohn, I. B. Autenrieth, and S. Borgmann. 2007. Yersinia outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. *Int. J. Med. Microbiol.* 297:235.
168. Autenrieth, S. E., I. Soldanova, R. Rosemann, D. Gunst, N. Zahir, M. Kracht, K. Ruckdeschel, H. Wagner, S. Borgmann, and I. B. Autenrieth. 2007. Yersinia enterocolitica YopP inhibits MAP kinase-mediated antigen uptake in dendritic cells. *Cell Microbiol.* 9:425.
169. Adkins, I., S. Schulz, S. Borgmann, I. B. Autenrieth, and S. Grobner. 2008. Differential roles of Yersinia outer protein P-mediated inhibition of nuclear factor-kappa B in the induction of cell death in dendritic cells and macrophages. *J. Med. Microbiol.* 57:139.
170. Monack, D. M., J. Meccas, N. Ghori, and S. Falkow. 1997. Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:10385.
171. Belz, G. T., C. M. Smith, D. Eichner, K. Shortman, G. Karupiah, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2004. Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J. Immunol.* 172:1996.
172. Neuenhahn, M., K. M. Kerksiek, M. Nauerth, M. H. Suhre, M. Schiemann, F. E. Gebhardt, C. Stemberger, K. Panthel, S. Schroder, T. Chakraborty, S. Jung, H. Hochrein, H. Russmann, T. Brocker, and D. H. Busch. 2006. CD8alpha+ dendritic cells are required for efficient entry of Listeria monocytogenes into the spleen. *Immunity.* 25:619.

173. Yarovinsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh, and A. Sher. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308:1626.
174. Garrett, W. S., L. M. Chen, R. Kroschewski, M. Ebersold, S. Turley, S. Trombetta, J. E. Galan, and I. Mellman. 2000. Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 102:325.
175. Tam, M. A., M. Sundquist, and M. J. Wick. 2008. MyD88 and IFN- α differentially control maturation of bystander but not Salmonella-associated dendritic cells or CD11c^{int}CD11b⁺ cells during infection. *Cell Microbiol.* 10:1517.
176. Shortman, K., and W. R. Heath. 2010. The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* 234:18.
177. Cella, M., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9:10.
178. Heinrich, P. C., J. V. Castell, and T. Andus. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 265:621.
179. De, B. G., V. Moulin, F. Tielemans, M. F. De, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1998. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by soluble and membrane proteins provided by antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 28:3161.
180. Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3:133.
181. Pulendran, B., P. Kumar, C. W. Cutler, M. Mohamadzadeh, D. T. Van, and J. Banichereau. 2001. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J. Immunol.* 167:5067.
182. Huang, L. Y., Reis e Sousa, Y. Itoh, J. Inman, and D. E. Scott. 2001. IL-12 induction by a TH1-inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-10. *J. Immunol.* 167:1423.
183. McKee, A. S., F. Dzierszinski, M. Boes, D. S. Roos, and E. J. Pearce. 2004. Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 173:2632.
184. Sundquist, M., and M. J. Wick. 2005. TNF- α -dependent and -independent maturation of dendritic cells and recruited CD11c^(int)CD11b⁺ Cells during oral Salmonella infection. *J. Immunol.* 175:3287.
185. Kamath, A. T., J. Pooley, M. A. O'Keeffe, D. Vremec, Y. Zhan, A. M. Lew, A. D'Amico, L. Wu, D. F. Tough, and K. Shortman. 2000. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J. Immunol.* 165:6762.

186. Ginhoux, F., K. Liu, J. Helfft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. A. Lira, E. R. Stanley, M. Nussenzweig, and M. Merad. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med.* 206:3115.
187. McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, S. T. De, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman, and J. J. Peschon. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95:3489.
188. Onai, N., A. Obata-Onai, R. Tussiwand, A. Lanzavecchia, and M. G. Manz. 2006. Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development. *J. Exp. Med.* 203:227.
189. Karsunky, H., M. Merad, A. Cozzio, I. L. Weissman, and M. G. Manz. 2003. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 198:305.
190. Sarrazin, S., N. Mossadegh-Keller, T. Fukao, A. Aziz, F. Mourcin, L. Vanhille, M. L. Kelly, P. Kastner, S. Chan, E. Duprez, C. Otto, and M. H. Sieweke. 2009. MafB restricts M-CSF-dependent myeloid commitment divisions of hematopoietic stem cells. *Cell* 138:300.
191. Anderson, K. L., H. Perkin, C. D. Surh, S. Venturini, R. A. Maki, and B. E. Torbett. 2000. Transcription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 164:1855.
192. Guerriero, A., P. B. Langmuir, L. M. Spain, and E. W. Scott. 2000. PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood* 95:879.
193. Ichikawa, E., S. Hida, Y. Omatsu, S. Shimoyama, K. Takahara, S. Miyagawa, K. Inaba, and S. Taki. 2004. Defective development of splenic and epidermal CD4+ dendritic cells in mice deficient for IFN regulatory factor-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:3909.
194. Suzuki, S., K. Honma, T. Matsuyama, K. Suzuki, K. Toriyama, I. Akitoyo, K. Yamamoto, T. Suematsu, M. Nakamura, K. Yui, and A. Kumatori. 2004. Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11bhighCD8alpha- dendritic cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:8981.
195. Tamura, T., P. Taylor, K. Yamaoka, H. J. Kong, H. Tsujimura, J. J. O'Shea, H. Singh, and K. Ozato. 2005. IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity. *J. Immunol.* 174:2573.
196. Schmees, C., C. Prinz, T. Treptau, R. Rad, L. Hengst, P. Volland, S. Bauer, L. Brenner, R. M. Schmid, and M. Gerhard. 2007. Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* 132:1820.

197. Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, M. P. Sory, and G. R. Cornelis. 2002. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect. Immun.* 70:4165.
198. Rosqvist, R., A. Forsberg, M. Rimpilainen, T. Bergman, and H. Wolf-Watz. 1990. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol. Microbiol.* 4:657.
199. Yao, T., J. Meccas, J. I. Healy, S. Falkow, and Y. Chien. 1999. Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J. Exp. Med.* 190:1343.
200. Kramer, U., and C. A. Wiedig. 2005. *Y. enterocolitica* translocated Yops impair stimulation of T-cells by antigen presenting cells. *Immunol. Lett.* 100:130.
201. Boland, A., and G. R. Cornelis. 1998. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect. Immun.* 66:1878.
202. Hathaway, L. J., G. E. Griffin, P. J. Sansonetti, and J. D. Edgeworth. 2002. Human monocytes kill *Shigella flexneri* but then die by apoptosis associated with suppression of proinflammatory cytokine production. *Infect. Immun.* 70:3833.
203. Rojas, M., M. Olivier, P. Gros, L. F. Barrera, and L. F. Garcia. 1999. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J. Immunol.* 162:6122.
204. Sing, A., A. Roggenkamp, A. M. Geiger, and J. Heesemann. 2002. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J. Immunol.* 168:1315.
205. Weeks, S., J. Hill, A. Friedlander, and S. Welkos. 2002. Anti-V antigen antibody protects macrophages from *Yersinia pestis* -induced cell death and promotes phagocytosis. *Microb. Pathog.* 32:227.
206. Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, V. Lafont, P. Mangeat, J. Heesemann, and B. Rouot. 1997. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infect. Immun.* 65:4813.
207. Ruckdeschel, K., O. Mannel, and P. Schrottner. 2002. Divergence of apoptosis-inducing and preventing signals in bacteria-faced macrophages through myeloid differentiation factor 88 and IL-1 receptor-associated kinase members. *J. Immunol.* 168:4601.
208. Ruckdeschel, K., G. Pfaffinger, R. Haase, A. Sing, H. Weighardt, G. Hacker, B. Holzmann, and J. Heesemann. 2004. Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. *J. Immunol.* 173:3320.

209. Cedric Cheminay, Annette Möhlenbrink and Michael Hensel. 2005. Intracellular Salmonella Inhibit Antigen Presentation by Dendritic Cells *The Journal of Immunology* 174:2447-2449
210. Susan M. Bueno, Pablo A. Gonzalez, Leandro J. Carreno, Jaime A. Tobar, Guido C. Mora, Cristian J. Pereda, Flavio Salazar-Onfray and Alexis M. Kalergis. 2008. The capacity of Salmonella to survive inside dendritic cells and prevent antigen presentation to T cells is host specific. *Immunology* 124(4):522-33.
211. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. 2000. CD8⁺ but not CD8⁻ dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells *in vivo*. *J. Exp. Med* 192: 1685–96
212. Steinman RM, Cohn ZA. 1973 Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice, *J Exp Med* 137:1142-1162

8 Anhang

8.1 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden vor dem Einreichen der Dissertation als Paper oder Poster / Kongreßvorträge veröffentlicht:

➤ Publikationen

Immune Evasion by *Yersinia enterocolitica*: Differential Targeting Of Dendritic Cell Subpopulations *In Vivo*

S.E. Autenrieth*, T.-R. Linzer*, C. Hiller, B. Keller, P. Warnke, M. Köberle, E. Bohn, T. Biedermann, H.-J. Bühring, G.J. Hämmerling, H.-G. Rammensee, I.B. Autenrieth
(* first two authors contributed equally, PLoS Pathogens, published 24 Nov 2010)

Detrimental role of dendritic cells during *Y. enterocolitica* infection *in vivo*

P. Warnke*, T.-R. Linzer, G. Hämmerling, S. Schmitz, I.B. Autenrieth, S. E. Autenrieth (In preparation)

➤ Kongreßbeiträge (eigene)

Yersinia enterocolitica inhibits T cell priming by modulating DC subpopulations *in vivo*
Vortrag und Posterpräsentation

European Congress of Immunology, Berlin 2009

Yersinia enterocolitica inhibits T cell priming by modulating DC subpopulations
Posterpräsentation

World Immune Regulation Meeting IV – Davos 2010

➤ Weitere Publikation:

Frequent non-reciprocal exchange in microsatellite-containing-DNA-regions of vertebrates

J. O. Ziegler*, M. Wälther, T. R. Linzer, G. Segelbacher, M. Stauss, C. Roos, V. Loeschcke and J. Tomiuk (J. Zool Systematics and Evolutionary Research Volume 47 Issue 1, Pages 15 – 20; 2009)

8.2 Lebenslauf

8.3 Dank

Danke an alle Mitarbeiter des Instituts für Zellbiologie, Abteilung Immunologie und des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene für den wissenschaftlichen Austausch, für die Tipps und für die vielen Tassen Kaffee...

Herr Prof. Dr. H.-G. Rammensee betreute die Arbeit mit Engagement, Ideen und Anregungen. *Ich danke Dir, dass Du immer Zeit hattest, für die Fragen, die zum Nachdenken führten, sowie für den motivierenden Einfluss, von dem ich viel lernen konnte.*

Einen herzlichen Dank geht an Herr Prof. Dr. Tomiuk für seine Bereitschaft diese Dissertation vor der Fakultät für Biologie der Eberhard Karls Universität Tübingen zu vertreten. *Ich danke Ihnen, dass Sie mich seit dem Studium mit Ihrer hilfsbereiten & direkten Art durch die Forschung begleitet haben.*

Weiterhin danke ich Frau Dr. Stella E. Autenrieth und Herrn Prof. Dr. Autenrieth für die aktive Betreuung, die Einführung in die Yersinia und DC Welt. *Danke Dir Stella, von Herzen, für die lebensnotwendige Kaffeemaschine im Büro und für das „unabhängige Forschen und Promovieren“.*

Mein besonderer Dank geht an die „kleine“ DC-Gruppe: Steffi Krajewski, Sandra Schmitz und Philipp Warnke – *war eine sehr schöne Zeit mit Euch! Vor allem, dass Ihr mir mit Wort und Tat beiseite standet (egal wie dunkel es war), für die Korrektur der Dissertation, mich auch außerhalb des Labors begleitet und dass ihr mir zu lieben Freunde geworden seid.*

Und an die „große“ DC-Gruppe: Doreen Drechsler, Lisa Güttler, Daniela Gunst, Jens Schreiner, Manina Günther, Clara Hiller, Birgit Keller, Nina Baur, Cecilia Lucero Estrada, Karina Pasquevich, Florian Ullbrich. *Ich danke Euch für die vielen schönen Momente, für die Orchideen (Jens!), Nobelpreisverleihung (Manina & Doreen!) und falls ich heirate, werde ich Euch natürlich zu dem großen Ereignis einladen...*

Bedanken möchte mich außerdem ganz herzlich bei: Magnus Schindler, Philipp Oberhettinger, Martin Köberle, Alexander Mertens, Simon Heilbronner, Verena Schindler, Jessica Spreu, Doris Flach, Juliane Klenk, Lynne Yakes, Gerhard Hörr, Gudrun Harer, Martin Köberle, Ulrike Großkinsky, Julia Frick, Julia Geisel, Alexandra Wittmann, Martina Müller, Sabrina Treml, Alexandra Siegfried, Birgit Manncke, Erwin

Bohn, Michaela Fritz, Bettina Hackl, Frau Grauer, Frau Bauer-Haffter, Monika Schütz, Patrick Weissgerber, Helmut Rausch und seinem Team, Sebastian Attig, Beate Pömmerle und allen Tierpflegern des HNO- und VG-Tierstalls.

Meinen Freunden Antonia Fehrenbach, Katja Mader, Sandra Drescher, Katja Huber und Annika Thielecke bei denen ich mich für ihre aufbauenden Worte und ihre Warmherzigkeit bedanke...*Danke, dass ihr mich stets begleitet und mit mir immer noch auf den Tischen „tanzt“.*

Dr. Petra und Robert Lanz für die liebevolle Betreuung von Damijan. *Ohne Euch hätte ich keine Seminare besuchen und keine Abende im Labor verbringen können.*

Ich wünsche Euch allen beruflich und privat eine glückliche Zukunft.

Am Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meinem Freund Damir Ciganovic, meiner Mama und meiner kleinen „Nervensäge“ Damijan für ihre liebevolle Unterstützung und Verständnis bedanken. *Ich liebe Euch.*