

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Immunhistologische Analyse Dendritischer Zellen im Ver-
lauf einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica in vivo***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Clara Elise Hiller
aus
Hamburg

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. I. B. Autenrieth

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Hartl

„Schreiben ist leicht. Man muss nur die falschen Wörter weglassen.“

Mark Twain

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Dendritische Zellen	9
1.1.1	Aktivierung und Reifung der DCs	12
1.1.2	Die DCs der Maus	15
1.2	Die Toll like Rezeptoren (TLR)	17
1.3	Inflammatorische Zytokine der Phagozyten	19
1.4	Aktivierung von T-Lymphozyten	20
1.5	Die Gattung Yersinia	23
1.5.1	Pathogenitätsfaktoren von <i>Y. enterocolitica</i>	24
1.5.2	Typ III Sekretionssystem (TTSS) von <i>Y. enterocolitica</i>	25
1.5.3	Die Immunantwort auf <i>Y. enterocolitica</i>	27
1.5.4	<i>Yersinia enterocolitica</i> als Träger von Impfstoffen	29
1.6	Die Milz	31
1.6.1	Verteilung der Immunzellen in der Milz	32
1.7	Zielsetzung	34
2	Material und Methoden	36
2.1	Material	36
2.1.1	Versuchstiere	36
2.1.2	Bakterienstamm	37
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	37
2.1.4	Medien und Puffer	38
2.1.5	Antikörper	38
2.1.6	FISH Sondenmix	39

2.1.7	Kitsysteme.....	39
2.1.8	Geräte.....	39
2.1.9	Plastik- und Verbrauchsmaterialien.....	40
2.1.10	Software.....	41
2.2	Methoden.....	41
2.2.1	Infektion von Mäusen.....	41
2.2.2	Entnahme der Milz.....	41
2.2.3	Herstellung und Fixierung von Gefrierschnitten.....	42
2.2.4	Färbung.....	42
2.2.5	CD11c und DAPI.....	42
2.2.6	CD11c, WA-vital und DAPI.....	43
2.2.7	Hämatoxylin – Eosin – Färbung (HE-Färbung).....	44
2.2.8	Fluoreszenz – in – situ – Hybridisierung (FISH).....	45
2.2.9	Fluoreszenzmikroskopie.....	46
2.2.10	Lichtmikroskopie von H&E-Schnitten.....	46
2.2.11	Bildbearbeitung mit Photoshop.....	47
2.2.12	Auswertung Abszesse mit dem Statistischen Programm.....	47
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Verteilung der DCs in der Milz im Verlauf einer Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	48
3.2	Verteilung DCs in der Milz während früher Infektionszeitpunkte mit <i>Y. enterocolitica</i>	52
3.3	Vergleich der Abszessbildung und -lokalisierung in Wildtyp- und Knockout-Mäusen.....	57

3.4	Interaktion Yersinien und DCs	68
4	Diskussion	77
4.1	Verteilung der DCs in der Milz während einer Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	79
4.2	Einfluss einer <i>Y. enterocolitica</i> Infektion auf die Anzahl der DCs und Abszessbildung innerhalb der Milz.....	82
4.3	Interaktion Yersinien und DCs.....	85
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	86
5	Zusammenfassung	89
6	Abkürzungsverzeichnis	91
6.1	Einheiten und Größenordnungen.....	93
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	94
8	Referenzen	98
9	Veröffentlichung	113
10	Danksagung	114
11	Lebenslauf	115

1 Einleitung

Jedes Lebewesen ist vorübergehend oder andauernd von Mikroorganismen besiedelt. Die Mehrzahl ist für den Wirt unschädliche, normale Flora, die sogar einen gewissen Schutz gegen pathogene Keime darstellt wie bei Menschen die Bakterienflora in bestimmten Darmabschnitten, auf der Haut und Schleimhaut. Dagegen schädigen andere Mikroorganismen Gewebe und erzeugen Krankheiten. Wirbeltiere haben eine Reihe von Abwehrmechanismen entwickelt, um die normale Kolonisierung durch Mikroorganismen einzudämmen, pathogene Keime abzuwehren und fehlerhafte körpereigene Zellen zu zerstören. Bei Säugetieren wird das Immunsystem in unspezifische angeborene Abwehr und spezifische adaptive Abwehr unterteilt.

Zur unspezifischen Abwehr gehört zuerst die schützende Barrierefunktion von Haut und Schleimhaut. Ist diese durchbrochen, erkennen Makrophagen (MF), Dendritische Zellen (DCs), natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Granulozyten körperfremde Merkmale anhand von Rezeptoren, die genetisch kodierte Muster erkennen („Pattern-recognition receptors“, PRRs). Auch das Komplementsystem reagiert mit Körperfremdem. So wird ein breites Spektrum von Erregern abgedeckt, ohne dass das Immunsystem schon einmal mit ihnen in Kontakt gekommen ist. Es existieren drei Gruppen von Phagozyten: Granulozyten, MF und DCs. Sie fungieren nicht nur als phagozytische Zellen, sondern spielen eine Schlüsselrolle in der Einleitung und Modulation der unspezifischen Immunabwehr. Phagozyten können sowohl opsonierte (mit Antikörpern oder Komplement markierte) als auch viele Fremdkörper direkt erkennen. An ihrer Oberfläche befinden sich verschiedenste Rezeptoren wie PRRs, Scavenger-, Mannose-, Glucan- oder Komplement-Rezeptoren.

Die Granulozyten werden in neutrophile, basophile und eosinophile unterschieden, wobei den Großteil die neutrophilen Granulozyten ausmachen. Sie zirkulieren im Blut und werden bei Entzündungen und Infektionen durch Chemotaxis ins Gewebe gelockt und können eine große Menge von Bakterien zerstören. Jedoch haben sie eine sehr kurze Lebensdauer und gehen kurz nach der Phagozytose in die Apoptose über und müssen wiederum durch MF beseitigt werden¹. Durch ihre intrazellulären Oxi-

dantien und Proteinase sind Granulozyten sehr wirksam gegen Bakterien, aber auch sehr gewebeschädigend und proinflammatorisch.

MF sind in nahezu allen Geweben vorhanden, wohingegen ihre Vorläuferzellen, die Monozyten, im Blut zirkulieren. Sie sind wichtig für die normale Organfunktion, wie zum Beispiel als Osteoklasten zum ständigen Umbau des Knochenmarks oder den Abbau von apoptotischen und nekrotischen Zellen. Da sich MF in allen Geweben befinden, kommen sie als erstes mit Pathogenen in Kontakt und bewirken über Chemokine und Zytokine die Entzündungsreaktion und die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und weitere Monozyten. Ihre Hauptaufgabe ist es, die Immunantwort zu verstärken und Zellreste abzubauen. MF sind weniger bakterizid als Granulozyten, können aber Antigene präsentieren und sind an vielen physiologischen Prozessen beteiligt, wie dem Lipidstoffwechsel, der Bildung von Gerinnungsfaktoren, der Antikörper-, Transferrin- und Komplementsynthese².

DCs gehören ebenfalls zu den phagozytischen und Antigenpräsentierenden Zellen (APCs). Ihre Hauptaufgabe besteht jedoch in der T-Zell-Aktivierung. Das macht sie zu einem wichtigen Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunabwehr. Sie wandern vom Knochenmark über das Blut in das periphere Gewebe ein, wo sie extrazelluläre Flüssigkeit und Fremdkörper aufnehmen. Während einer Infektion reifen die DCs heran und können naive T-Lymphozyten aktivieren.³

Die spezifische Immunabwehr besteht aus B- und T-Lymphozyten und setzt verzögert ein, ist aber langfristig und zielgerichteter. Es werden für den Erreger spezifische Strukturen (Antigene) erkannt und passende Antikörpern (AK) gebildet. Dadurch findet eine gezielte zelluläre Abwehr statt und das Immungedächtnis wird ausgebildet.

Obwohl die unspezifische Abwehr effektiv ist, schützt sie nicht vor allen eindringenden Mikroorganismen, da diese evolutionäre Wege gefunden haben, die Abwehr zu umgehen. Die spezifische Abwehr hat mittels somatischer Rekombination ein unerschöpfliches Repertoire an variablen Rezeptoren und kann daher fast alles Körperfremde erkennen und beseitigen. Das passende Antigen kann dabei ein weit verbreitetes Merkmal oder eine ganz spezielle Struktur eines Mikroorganismus sein. Jeder Lymphozyt trägt nur einen Rezeptor-Typ mit einer einzigartigen Antikörperstruktur an

seiner Oberfläche. Dies macht eine klonale Selektion auf Grund der Affinität der AK zu ihren Liganden möglich. Mittels negativer und positiver Selektion während der Lymphozytenreifung können Lymphozyten, welche auf körpereigene Merkmale gerichteten AK (Auto-AK) tragen, beseitigt werden. Das Immungedächtnis ermöglicht es, bei einer erneuten Infektion mit einem bekannten Organismus eine schnellere und potentere Immunantwort einzuleiten.

Es gibt zwei Haupttypen von Lymphozyten: B-Lymphozyten, die im Knochenmark reifen und der Ursprung der zirkulierenden AK sind und T-Lymphozyten, die im Thymus reifen und Peptide von Krankheitserregern erkennen, die von MHC-Molekülen („major histocompatibility complex“) auf infizierten Zellen oder von APCs präsentiert werden.⁴ Nachdem die naiven Lymphozyten in den zentralen lymphatischen Organen (Knochenmark, Thymus) gereift sind, wandert ein Großteil in die peripheren lymphatischen Organe wie Milz, Lymphknoten und in mukosales lymphatisches Gewebe in Darm, Atemwegen, Urogenitaltrakt und Schleimhäuten. Eine geringere Anzahl zirkuliert im Blut und der Lymphflüssigkeit.

1.1 Dendritische Zellen

Die adaptive Immunabwehr hat sich durch evolutionären Druck entwickelt. Ihre wichtigste Fähigkeit ist, durch somatische Rekombination und Umlagerung von Genabschnitten eine unendliche Variabilität von antigenspezifischen Rezeptoren zu erhalten. Jedoch bedarf es der Instruktion und Regulation durch APCs, um dieses potente System zu kontrollieren. APCs sind MF, B-Zellen, Langerhanszellen und DCs. DCs sind eine heterogene Gruppe hochspezialisierter APCs, die strategisch an den Grenzen zur Außenwelt positioniert sind. Sie bilden eine Brücke zwischen adaptiver und angeborener Immunabwehr, transportieren Antigene von der Peripherie zu den lymphatischen Organen und leiten durch T-Zell-Aktivierung und Stimulierung des Immungedächtnisses eine Immunantwort ein. DCs gehen im Knochenmark aus hämatopoetischen pluripotenten Stammzellen hervor. Sowohl aus myeloiden als auch

aus lymphatischen Vorläuferzellen entwickeln sich DCs mit unterschiedlichen Fähigkeiten und Aufgaben. Beim Menschen unterscheidet man zwei große Gruppen: Die myeloischen dendritischen Zellen (mDCs) und die plasmacytoiden dendritischen Zellen (pDCs).^{5, 6} Die mDCs präsentieren Antigene und aktivieren B-, T- und NK-Zellen. Die pDCs sind eine eigene Zelllinie, die als Reaktion auf Virusinfektionen große Mengen von Interferonen produzieren können, bei der T-Zell-Aktivierung aber keine Rolle spielen.⁷ In dieser Arbeit beziehen sich alle Hinweise zu DCs auf die mDCs.

Vier Entwicklungsstufen können unterschieden werden: (1) Knochenmark-Vorläuferzellen; (2) DCs, die in Blut, Lymphe und Lymphgewebe zirkulieren und auf Erregererkennung mit der massiven Ausschüttung von Zytokinen wie $\text{IFN-}\gamma$ reagieren; (3) im Gewebe befindliche unreife DCs, welche Antigene durch Phagozytose und Makropinozytose aufnehmen und (4) reife DCs, die in sekundäre lymphatische Organe einwandern und große Mengen kostimulierender Moleküle exprimieren, um das Heranreifen von Effektorzellen zu stimulieren.

DCs kommen in fast allen Geweben vor, besonders an den Körperoberflächen wie Haut und Schleimhaut.⁸ Ihre Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wandern in Körpergewebe und lymphatisches Gewebe ein und verbleiben dort als ruhende phagozytische Zellen. Naive DCs exprimieren auf ihrer Zelloberfläche Chemokinrezeptoren (CCR1, -2, -5, -6 und CXCR1 und -2), deren Chemokine von peripheren Organen produziert werden und die Einwanderung von naiven DCs in peripheres Gewebe regulieren.⁹ DCs haben eine sehr hohe phagozytische Aktivität und auch im nicht aktivierten Zustand prozessieren sie körpereigene Antigene und wandern zu einem kleinen Prozentsatz in lymphatisches Gewebe ein. Dort helfen diese „Eigenantigene“ die Toleranz der T-Zellen gegenüber körpereigenem Gewebe zu erhalten.¹⁰ DCs werden als Bestandteil der angeborenen Immunabwehr in entzündetem Gewebe durch direkten Kontakt mit Krankheitserregern und Zytokinen aktiviert, nehmen am Infektionsherd Antigene auf und laden diese auf MHC-Moleküle. Anschließend wandern die aktivierten, reifen Zellen in lymphatisches Gewebe ein, um dort naiven CD4^+ - und CD8^+ -T-Zellen ihre Antigene MHC-vermittelt zu präsentieren und seltene antigenspezifischen Lymphozyten heraus zu filtern. Sie bewirken das Heranreifen von antigen-

spezifische Zellen zu Effektorzellen, wie T-Helferzellen (T_h -Zellen) und zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) und initiieren deren Einwanderung zum Infektionsherd im periphere Gewebe (siehe Abb. 1).¹¹ Außerdem sorgen DCs für das Überleben von $CD4^+$ -T-Zellen und T-Gedächtniszellen und stimulieren zusammen mit T-Zellen das Heranreifen von B-Effektorzellen.

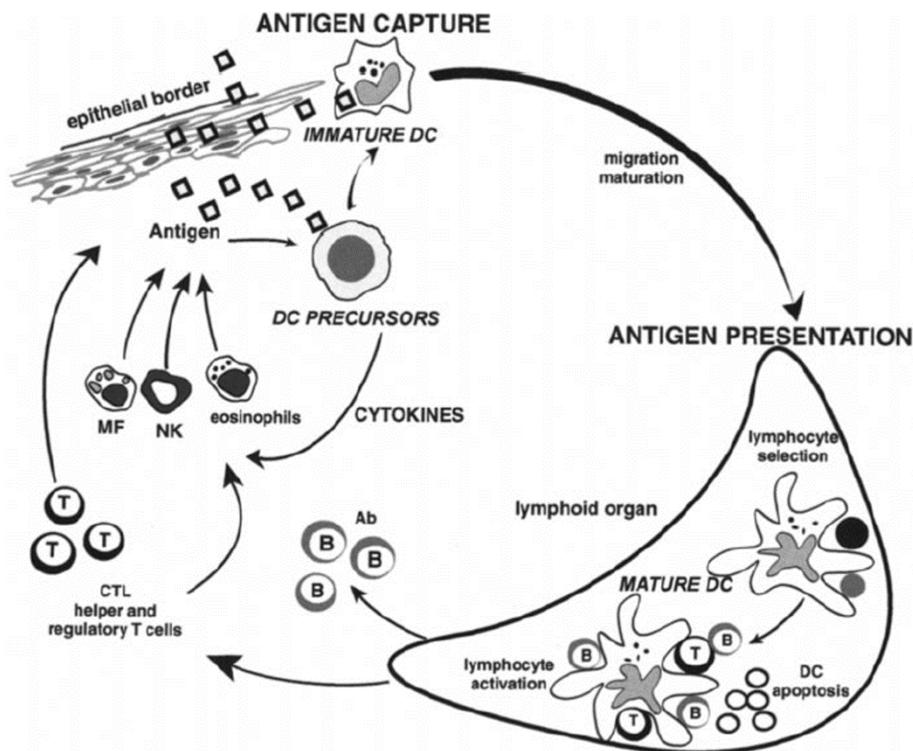


Abb. 1: Der Lebenszyklus einer DC.³ Zirkulierende Vorläufer-DCs gelangen als unreife DCs in peripheres Gewebe oder treffen direkt auf Pathogene, welche die Zytokinproduktion und Aktivierung von Eosinophilen, MF und NK-Zellen bewirken. Nach Antigenaufnahme wandern unreife DCs in lymphatische Organe, wo sie reifen und Antigene auf MHC-Molekülen präsentieren. Dies erlaubt eine Selektion von seltenen, zirkulierenden antigenspezifischen Lymphozyten. Diese aktivierten T-Zellen tragen zur endgültigen Reifung der DCs bei, welche wiederum die Reifung und Differenzierung der Lymphozyten bedingt. Aktivierte T-Lymphozyten wandern in das beschädigte Gewebe, da sie in der Lage sind, entzündetes Epithel zu durchtreten. T-Helferzellen schütten Zytokine aus, welche die Aktivierung von MF, NK-Zellen und Eosinophilen erlaubt. Zytotoxische T-Zellen lysieren die infizierten Zellen. B-Zellen werden durch den Kontakt mit T-Zellen und DCs aktiviert und wandern anschließend in LF, wo sie zu Plasmazellen reifen und Antikörper produzieren.

1.1.1 Aktivierung und Reifung der DCs

Unreife DCs befinden sich im peripheren Gewebe und nehmen dort körpereigene und -fremde Antigene auf. Allerdings sind sie in diesem Stadium noch nicht in der Lage Antigene effektiv zu präsentieren. Unreife DCs akkumulieren MHC-Moleküle intrazellulär und präsentieren nur einen kleinen Teil an der Zelloberfläche.^{12, 13}

Es sind drei verschiedene Wege bekannt, wie DCs Antigene aufnehmen. (1) Makropinozytose ermöglicht es unspezifisch eine große Menge Flüssigkeit in intrazelluläre Vakuolen aufzunehmen. (2) Phagozytose wird über Rezeptoren wie den Mannoserezeptor¹⁴ und DEC 205¹⁵ vermittelt. Diese Rezeptoren binden spezifisch an Oberflächenantigene von Bakterien und Viren. (3) Lösliche Antigene werden über Clathrin vermittelte Endozytose aufgenommen. Hierbei handelt es sich zum Teil um sehr große Moleküle, die über spezielle Rezeptoren in der Plasmamembran („coated pits“) aufgenommen werden.¹⁶

Auf unreifen DCs werden eine Reihe von Rezeptoren exprimiert: C-Typ Lektine¹⁷, Rezeptoren für die Fc-Region von Immunglobulinen (FcRs)¹⁸, Komplement-Rezeptoren¹⁹, Rezeptoren für „heat-shock“ Proteine²⁰ und Scavenger-Rezeptoren²¹.

Alle Antigene, die über diese oben genannten drei Wege in die DC gelangen, werden auf MHC-Moleküle der Klasse II geladen. Ein weiterer Eintrittsweg für Antigene ist das direkte Eindringen in das Zytosol, zum Beispiel bei einer Virusinfektion. Die Viren benutzen für ihre Vermehrung den Proteinsynthese-Apparat der DC und es werden virale Peptide auf MHC-Moleküle der Klasse I geladen und an der Zelloberfläche präsentiert, wie es bei jeder anderen, von einem Virus infizierten Zelle der Fall ist.

Viren, die DCs nicht befallen, können mittels „cross-priming“ von DCs von MHC-I-Molekülen präsentiert werden. Hierbei werden apoptotischen Zellen oder Tumorzellen mittels Phagozytose oder Makropinozytose aufgenommen und anschließend im Zytosol auf MHC-I-Moleküle geladen.²²

Tritt eine Infektion auf, wird durch Signale von PRRs wie Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und Chemokinen die Reifung der DCs eingeleitet (siehe Abb. 2). Die DCs exprimieren mehrere Vertreter der TLR-Familie, die bei der Erkennung von verschiedenen Krank-

heitserregern eine wichtige Rolle spielen und einen entsprechenden Signalweg einleiten. Andere Rezeptoren wie Komplementrezeptoren oder phagozytische Rezeptoren können sowohl zur Aktivierung führen als auch bei der Phagozytose mitwirken. TLR-Aktivierung bewirkt die veränderte Expressierung von Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche und die DC kann in peripheres lymphatisches Gewebe einwandern. Auch die Antigenprozessierung wird durch TLR-Liganden gesteigert.²³ Die Veränderung der Oberflächenrezeptoren auf DCs bezeichnet man als „Lizenzierung“. Der Rezeptor CCR7 spielt eine Schlüsselrolle in der Migration von DCs in lymphatisches Gewebe und die T-Zell-Region. Er erkennt die Chemokine CCL19 und -21, welche von lymphatischem Gewebe produziert werden, und löst die Wanderung durch Lymphgefäße zu lokalem Lymphgewebe aus.⁹ CCL19 nimmt Einfluss auf die Reifung der DCs, indem es kostimulierende Moleküle hochreguliert und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12, IL-1 β und TNF stimuliert. Außerdem verstärkt es die Endozytose, die Expansion von Dendritenarmen und verhindert Apoptose.²⁴ Die Aufgabe von CCL19 und -21 ist, die DC in einen prämaturen Zustand zu bringen, noch bevor sie die T-Zell-Region im lymphatischen Gewebe erreicht. Eine weitere Komponente zur Aktivierung der zellvermittelten Immunantwort ist die Interaktion zwischen dem Rezeptor CD40 und seinem CD40-Liganden (CD40L). CD40 kommt auf B-Zellen, Monozyten, DCs, Epithel- und Endothelzellen vor, wohingegen der CD40L nur von aktivierten CD4⁺-T-Lymphozyten exprimiert wird.^{25, 26} T_h-Zellen interagieren mit den DCs und anderen APCs mittels des CD40-Rezeptors und befähigen diese, CTLs direkt zu aktivieren.²⁷⁻²⁹ Ist die DC schließlich im lymphatischen Gewebe angekommen, weist sie einen vollständig veränderten Phänotyp auf. Reife DCs können keine Antigene mehr aufnehmen, aber eine große Menge von MHC-Molekülen der Klasse I und II werden von intrazellulären Endozytose-Kompartiments an die Zelloberfläche verlagert und können zuvor aufgenommene Antigene stabil präsentieren.³⁰ Die Antigenprozessierung und die Beladung von MHC-Molekülen mit Peptiden werden optimiert und die Halbwertszeit der MHC-Moleküle verlängert.^{12, 13} DCs tragen nach der Aktivierung viele kostimulierende Moleküle, wie CD80 und CD86, die mit Rezeptoren von naiven T-Zellen interagieren. Reife DCs sezernieren

Adhäsionsmoleküle wie DC-SIGN und Chemokin CLL18, welches naive T-Zellen anlockt. Es werden Zytokine wie IL-6, -12, -18, IFN ausgeschüttet. Diese können weitere DCs aktivieren und ihre Expression kostimulierender Moleküle verstärken.³¹⁻³³

Die Homöostase und Zellteilung von DCs wird über den Lymphotoxin- β -Rezeptor und Flt3 reguliert.³⁴⁻³⁷ DCs teilen sich in lymphatischen Organen 10-14 Tage, bis sie von unreifen DCs ersetzt werden.³⁸ Flt3 reguliert außerdem die Balance zwischen regulatorischen T-Zellen (T_{reg} -Zellen) und DCs. Kommt es zu einem Verlust von T_{reg} -Zellen erhöht sich die DC-Zahl durch Zellteilung mittels Flt3-Produktion.³⁹

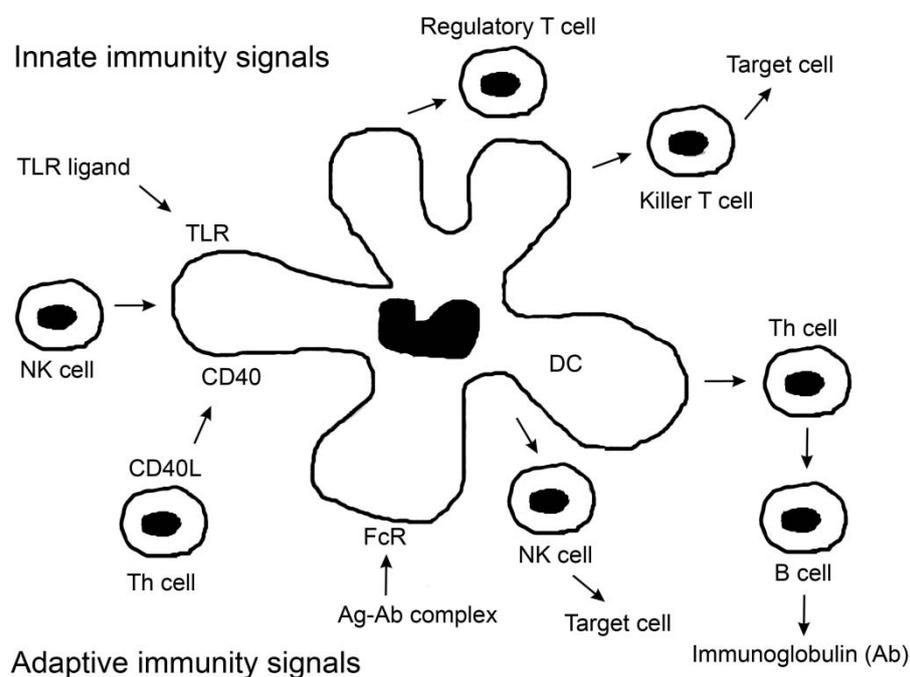


Abb. 2: Signalwege zur DC-Aktivierung.⁸ DCs spielen eine zentrale Rolle in der Immunantwort. Sie bekommen Signale über Oberflächenrezeptoren (TLR), welche pathogen assoziierte Rezeptoren erkennen. Zusätzliche Signale geben NK-Zellen. DCs regulieren wiederum das adaptive Immunsystem, indem sie positive oder negative Signale an T-Zellen geben. $CD4^+$ -T-Helferzellen liefern Signale für die $CD8^+$ -CTLs und B-Lymphozyten. Nach der Differenzierung zu Effektorzellen übernehmen CTL die Eradikation der Zielzellen. Die T-Helferzellen induzieren mittels CD40L die Reifung von DCs. B-Lymphozyten liefern indirekt Signale durch die Produktion von Antikörpern, welche an den Fc-Rezeptoren der DC binden können und ebenfalls die Reifung von DCs bewirken.

1.1.2 Die DCs der Maus

In der Maus wurden drei Arten von DCs beschrieben: die myeloischen, lymphatischen und plasmazytischen. Der Beweis für eine myeloische DC-Linie kommt aus *in vitro* Experimenten, in denen sich myeloische Vorläuferzellen unter dem Einfluss von „granulocyte monocyte colony-stimulating factor“ (GM-CSF) zu Granulozyten, Monozyten und mDCs entwickeln.^{40, 41} DCs können ebenfalls aus lymphatischen Vorläuferzellen entstehen.⁴²⁻⁴⁴

Die plasmazytischen DCs haben in der Maus den Phänotyp $CD11c^{low}$, $CD8\alpha^{-}$, $CD11b^{-}$, $CD45RA^{+}$ und sind wie die humanen pDCs in der Lage auf Grund von viralen oder mikrobiellen Stimuli große Mengen IFN- α zu produzieren.

Eine weitere, noch nicht sehr gut erforschte DC-Subtyp sind die regulatorischen DCs (DC_{reg}). Sie bremsen die T-Zellantwort durch die Aktivierung von regulatorischen $CD4^{+}$ -T-Zellen^{45, 46} und die Produktion von immunsupprimierenden Faktoren^{47, 48}.

Lymphatische (IDCs) und mDCs unterscheiden sich in Phänotyp, Lokalisation und Funktion. Ursprünglich wurden die DC-Subtypen in $CD8\alpha^{-} CD11b^{+}$ und $CD8\alpha^{+} CD11b^{-}$ unterteilt. Beide Subtypen exprimieren eine hohe Anzahl von $CD11c$, MHC-Klasse-II und kostimulierende Moleküle $CD86$ und $CD40$. Es wurde angenommen, dass $CD8\alpha^{-}$ ausschließlich myeloischer und $CD8\alpha^{+}$ DCs lymphatischer Abstammung sind. Dies wurde allerdings kürzlich durch Studien widerlegt, welche zeigten, dass beide DC-Arten sowohl aus lymphatischen als auch myeloischen Vorläuferzellen hervorgehen können.⁴⁹⁻⁵¹ Studien zu der Kinetik von markierten DC-Subtypen lassen vermuten, dass die Subtypen nicht auseinander hervorgehen und eine kurze Lebensdauer haben.⁵² Ein Teil der Differenzierung der Subtypen muss daher kurz nach den hämatopoetischen Vorläuferzellen erfolgen.

Oberflächenmarker wie $CD11c$, $CD11b$, $CD8\alpha$, $CD4$, MHC-II und $CD45RA$ werden benutzt, um DC-Subtypen zu charakterisieren und weiter in Populationen zu unterteilen. In den lymphatischen Organen wie Milz, Knochenmark, Lymphknoten und Thymus kommen unterschiedliche DC-Subtypen und Populationen vor. In der Milz kommen alle drei Subtypen von DCs vor und es werden drei unterschiedliche Populationen

beschrieben: CD8 α ⁻-DCs sind CD11b⁺, 33D1⁺ und B220⁻ und können weiterhin in CD4⁺ und CD4⁻ unterteilt werden; CD8 α ⁺-DCs sind CD205⁺, CD11b⁻ und CD4⁻.^{52, 53} Alle der Subtypen sind in der Lage T-Zellen zu aktivieren.⁵⁴ Marker wie DEC-205, CD1d und CD23 werden in großer Zahl auf CD8 α ⁺-DCs exprimiert.⁵⁵ CD8 α ⁺-DCs kommen in T-Zell-reichen Arealen, den periarteriellen Lymphscheiden (PALS) in der Milz und Lymphknoten vor. CD8 α ⁻-DCs befinden sich in der MZ von LF, können aber aufgrund von Signalen, wie LPS, in die PALS-Region einwandern.^{43, 56, 57} Die CD8 α ⁺-DCs produzieren mehr IL-12 und sind weniger phagozytotisch aktiv als CD8 α ⁻-DCs.⁵⁸⁻
⁶⁰ Es wurde festgestellt, dass CD8 α ⁺-DCs *in vitro* CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen weniger effizient aktivieren als CD8 α ⁻-DCs.^{61, 62} *In vivo* scheint es keinen Unterschied zu geben.^{58, 63} CD8 α ⁻-DCs prozessieren Antigene und aktivieren T-Zellen mit oder ohne Stimulation durch LPS, wohingegen CD8 α ⁺-DCs nur in Anwesenheit von LPS Antigene prozessieren und T-Zellen aktivieren können.⁶⁴

1.2 Die Toll like Rezeptoren (TLR)

TLRs gehören zu den PRRs und erkennen wenig variable mikrobiologische Merkmale einer Erregerklasse. Diese Merkmale sind meist essentiell für das Überleben der Spezies und können nicht durch Mutation abgeändert werden.^{65, 66} Sie werden pathogen-assoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs) genannt. Diese PAMPs können Lipide, Lipoproteine, Proteine und Nucleinsäure von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilzen sein.

Das Repertoire an PRRs ist begrenzt, da sie keimzell-kodiert sind.⁶⁷ Verschiedene PRR binden an entsprechende PAMPs, lösen spezifische Expressionsmuster und Signalkaskaden aus und bewirken eine auf den Erreger zugeschnittene Immunantwort. PRRs findet man in der Zellmembran, in Zellorganellen wie Endosomen und Lysosomen oder frei gelöst im Blut, in Gewebeflüssigkeit und Sekreten. Zu den sekretorischen PRRs gehören Collectine, Ficoline und Pentraxine. Mannose bindendes Lektin (MBL) kommt frei im Blutplasma vor. Transmembrane PRRs sind TLRs, C-Typ Lektine, der Scavenger-Rezeptor und Dectin-1. Zu den zytosolischen PRRs gehören unter anderem der nod-like Rezeptor (NLR), die RIG-I-like Helikase (RLH) und das „Melanoma Differentiation-Associated Gene 5“ (MDA5).⁶⁶

Die TLRs sind die am besten beschriebenen PRRs in Säugetieren. Sie werden von verschiedenen Immunzellen wie MF, DCs, B-Zellen, einigen T-Zellen, aber auch auf Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr bakterieller Infektionen. In Mäusen sind bis heute zwölf verschiedene TLRs beschrieben, die bestimmte PAMPs erkennen und eine entsprechende Immunantwort auslösen.⁶⁷ TLR4 erkennt Lipopolysaccharide (LPS), TLR2 Lipoteichonsäure (LTA), TLR5 Flaggelin, TLR9 die unmyelierte CpG-DNA von Bakterien und Viren, TLR3 doppelsträngige RNA, TLR7 einzelsträngige virale RNA⁶⁸. Die TLRs 1, 2, 4, 5 und 6 sind auf der Zelloberfläche exprimiert und erkennen hauptsächlich bakterielle Strukturen. Die TLRs 3, 7, 8 und 9 befinden sich intrazellulär in Endosomen sowie Lysosomen und erkennen virale Nucleinsäure (siehe Abb. 3). Alle PRRs können bei einer Infektion eine Vielzahl antimikrobieller und entzündlicher Prozesse auslösen, wie Op-

sonisierung, Aktivierung des Komplementsystems und proinflammatorische Signalkaskaden, Phagozytose, bis zur Einleitung der Apoptose.

TLRs kontrollieren die adaptive Immunantwort auf verschiedenen Ebenen. Sie aktivieren T_H1 -^{69, 70} und $CD8^+$ -T-Zellen⁷¹, induzieren die Produktion von Immunglobulinen und die Bildung des Immungedächtnisses. TLRs beeinflussen die Antigenaufnahme von DCs²³ sowie ihre Reifung und Zytokinproduktion⁷². Sie regulieren die T-Zell-Suppression, das Überleben von aktivierten T-Zellen⁷³, kontrollieren die B-Zell-Antwort⁷⁴ und können Memory-B-Zell aktivieren⁷⁵.

PAMP Detection by TLRs and Other PRRs			
Species	PAMPs	TLR Usage	PRRs Involved in Recognition
Bacteria, mycobacteria	LPS	TLR4	
	lipoproteins, LTA, PGN, lipoarabinomannan	TLR2/1, TLR2/6	NOD1, NOD2, NALP3, NALP1
	flagellin	TLR5	IPAF, NAI5
	DNA	TLR9	AIM2
	RNA	TLR7	NALP3
Viruses	DNA	TLR9	AIM2, DAI, IFI16
	RNA	TLR3, TLR7, TLR8	RIG-I, MDA5, NALP3
	structural protein	TLR2, TLR4	
Fungus	zymosan, β -glucan	TLR2, TLR6	Dectin-1, NALP3
	Mannan	TLR2, TLR4	
	DNA	TLR9	
	RNA	TLR7	
Parasites	tGPI-mutin (<i>Trypanosoma</i>)	TLR2	
	glycoinositolphospholipids (<i>Trypanosoma</i>)	TLR4	
	DNA	TLR9	
	hemozoin (<i>Plasmodium</i>)	TLR9	NALP3
	profilin-like molecule (<i>Toxoplasma gondii</i>)	TLR11	

Abb. 3: Übersicht verschiedener TLRs und PRRs.⁷⁶ Jeder der TLR erkennt eines oder mehrere PAMPs durch direkte Interaktion mit Molekülen auf der Pathogen-Oberfläche. Es gibt Überschneidungen zwischen TLRs und PRRs in der Erkennung von PAMPs.

1.3 Inflammatorische Zytokine der Phagozyten

Zytokine sind kleine Proteine, die bei Aktivierung oder Stimulierung einer Zelle freigesetzt werden. Sie sind wichtige Regulatoren der Immunabwehr und können autokrin (die Zelle selbst beeinflussend), parakrin (benachbarte Zellen beeinflussend) oder endokrin (systemisch) wirken. Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine. Bei einer Infektion werden von den Epithel- und Endothelzellen Zytokine ausgeschüttet. MF und DCs produzieren selbst Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-12 und TNF. IL-1 aktiviert das Gefäßendothel und Lymphozyten, bewirkt eine lokale Gewebeerstörung und Fieber.⁷⁷ IL-6 induziert ebenfalls Fieber und die Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie „serum amyloid protein“, C-reaktives Protein, Fibrinogen und MBL in der Leber.⁷⁸ IL-12 aktiviert NK-Zellen und induziert die Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen in T_H1-Zellen.⁷⁹ TNF aktiviert ebenfalls das Gefäßendothel und verstärkt seine Permeabilität, was zum erleichterten Eindringen von IgG, Komplement und Leukozyten führt und den Abtransport von Lymphflüssigkeit erhöht. IL-8 ist ein CXC Chemokin, lockt überwiegend neutrophile Granulozyten an und hat auf MF wenig Effekt⁸⁰. Monozyten wandern nicht nur bei akuten Entzündungen, sondern ständig in verschiedene Gewebe ein. Einer der Hauptregulatoren für ihre Verteilung in das Gewebe ist das Chemokin CXCL14². Während der ersten 12-24h wandern neutrophile Granulozyten in entzündetes Gewebe. Zusätzliche Monozyten werden verzögert angelockt durch Zytokine und Chemokine, die unter anderem von neutrophilen Granulozyten produziert werden¹. Die wichtigsten sind IFN- γ , TNF, IL-1 und IL-6. Nach 48-72h überwiegen dann MF in der Gesamtzahl der Leukozyten. Dieser Wechsel wird hauptsächlich von IL-6 bewirkt⁸¹.

Naive T-Zellen werden durch verschiedene, von Gewebezellen und MF produzierte Chemokine in das Gewebe gelockt (CXCL2, 10, 12, CCL2-5, 11, 12, 18). DCs wandern durch die Chemokine CCL2-5 und XCL1 ins Gewebe ein.

1.4 Aktivierung von T-Lymphozyten

Der entscheidende erste Schritt in der adaptiven Immunantwort ist die Aktivierung von reifen naiven antigenspezifischen T-Zellen durch professionelle APCs. APCs exprimieren drei verschiedene Proteine auf ihrer Zelloberfläche, die zur T-Zell-Aktivierung beitragen. (1) MHC-Moleküle, welche einen Teil der in der Zelle umgesetzten Proteine präsentieren und von T-Zell-Rezeptoren (TCRs) erkannt werden; (2) Kostimulierende Moleküle (CD80, CD86, CD40), die an komplementäre Rezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche binden; (3) Zell-Adhäsionsmoleküle (CD54, CD58), welche die T-Zelle lange genug an die APC binden, um aktiviert zu werden. Die Aktivierung der T-Zellen durch APCs führt zu ihrer Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen. Einige der T-Zellen differenzieren zu Gedächtniszellen. Die Proliferation und Differenzierung hängt mit der Zytokinproduktion (IL-2) eng zusammen. Es existieren zwei Typen von Effektorzellen. $CD8^+$ -T-Zellen oder auch CTLs, welche auf MHC-I Moleküle geladene, pathogene Peptide erkennen und direkt den Zelltod bewirken können. $CD4^+$ -T-Zellen erkennen auf MHC-II Moleküle geladene, pathogene Peptide. Abhängig von dem Muster der Zytokinsekretion entwickeln sich $CD4^+$ - T_H -Zellen in die Subtypen T_{H1} -, T_{H2} -, T_{H17} - und T_{reg} -Zellen. Die $CD8^+$ -T-Zellen können direkt zytotoxisch wirken oder durch Freisetzung einer Kombination aus Perforinen und Granzymen die Zielzelle in den programmierten Zelltod trieben.

APCs binden naive T-Zellen sehr effizient durch Wechselwirkung zwischen den Rezeptoren LFA-1 (CD11c/CD18), ICAM-3 (CD50) und CD2 auf der T-Zelle sowie ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), DC-SIGN und CD58 auf APCs.⁸²⁻⁸⁴ ICAM-3 und DC-SIGN sind speziell für die Wechselwirkung zwischen DC und T-Zelle verantwortlich (siehe Abb. 4).⁸⁵ Durch die relativ schwache kurzzeitige Bindung der Adhäsionsmoleküle hat die T-Zelle genügend Zeit, die Oberfläche der APC nach einem passenden MHC-Molekül abzusuchen. In dem Fall, dass ein TCR seinen spezifischen Liganden erkennt, wird durch ein Signal des TCR eine Konformationsänderung am LFA-1-Rezeptor ausgelöst und so dessen Affinität erhöht um eine mehrere Tage andauernde Bindung sicherzustellen.^{86, 87} In dieser Zeit vermehrt sich die T-Zelle und die Toch-

terzellen bleiben ebenfalls an der APC haften, um sich zu T-Effektorzellen zu differenzieren. Dieser Vorgang wird als Priming bezeichnet und beinhaltet drei Signalwege. (1) Antigen-spezifische Signale, welche durch die Bindung des TCR und Korezeptor CD4 oder CD8 an einen spezifischen Peptid-MHC-Komplex ausgelöst werden. Diese Bindung allein kann jedoch keine Differenzierung der T-Zelle auslösen. (2) Kostimulierende Signale wie B7-Moleküle, die auf APCs vorkommen und an den TZR CD28 binden.^{88, 89} (3) Verschiedene Zytokine, IL-6, IL-12 und TGF- β Signale, welche die T-Zell Differenzierung in die verschiedenen Subtypen von T-Effektorzellen steuern. Das von den T-Zellen selbst gebildete Zytokin IL-2 steuert in großem Maße die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen. Kommt eine T-Zelle mit ihrem spezifischen Antigen in Gegenwart von kostimulatorischen Signalen in Kontakt, so wird die IL-2-Synthese induziert. Ruhende naive T-Zellen besitzen einen unvollständigen IL-2-Rezeptor an der Zelloberfläche. Aktivierte T-Zellen können auf sehr geringe IL-2-Konzentrationen reagieren und sich mehrere Tage lang zwei- bis dreimal täglich teilen.⁹⁰

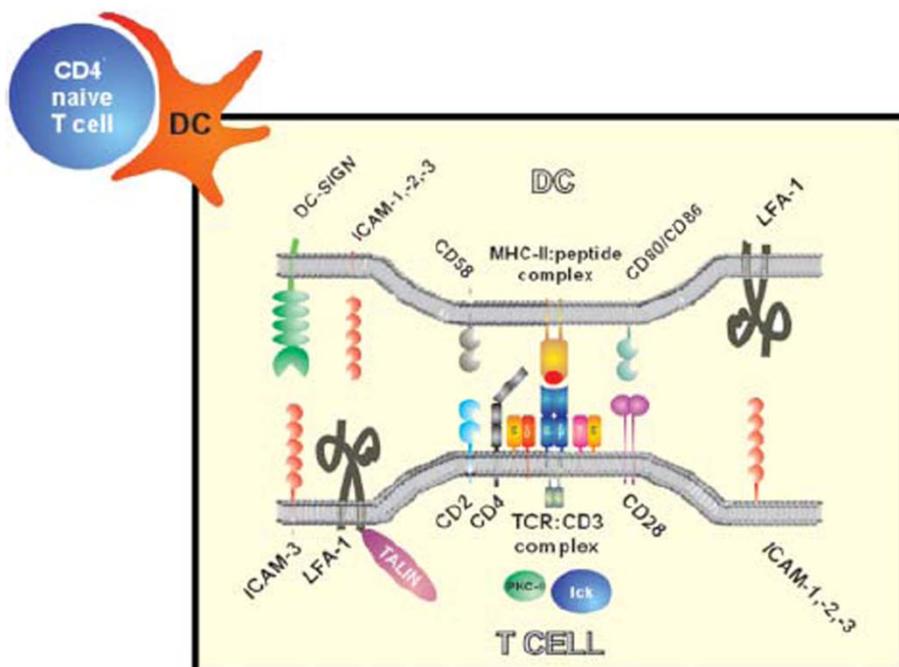


Abb. 4: Bindungsmoleküle zwischen T-Zelle und APC.⁸⁵ Querschnitt durch die Kontaktfläche der verschiedenen Adhäsionsmoleküle.

Unter bestimmten Bedingungen kann eine $CD8^+$ -Zelle direkt durch eine virusinfizierte Zelle aktiviert und zur Autostimulation durch IL-2 angeregt werden.⁹¹ Bei der Mehrzahl von Infektionen und auch bei der Aufrechterhaltung der Immunantwort erfordert die Aktivierung jedoch eine Stimulation durch APCs und $CD4^+$ -Effektorzellen (siehe Abb. 5).⁹² Die $CD8^+$ - und $CD4^+$ -T-Zelle binden an derselben APC an verwandte Antigene. $CD40$ ist ein TNF-Rezeptor auf DCs, der seinen Liganden auf der T-Zelle hat und beide Zellen gleichermaßen stimuliert.⁹³ Kostimulatorischen Moleküle der TNF-Familie sind $CD40$, $CD27$ und $4-1BB$ ($CD137$).⁹⁴ $CD27$ ist ein Rezeptor, der in der frühen Phase der Aktivierung den $CD70$ -Rezeptor von DCs bindet.⁹⁵ Der Ligand für den Rezeptor $4-1BB$ wird auf aktivierten DCs, MF und B-Zellen exprimiert und trägt ebenfalls zur Kostimulation bei.⁹⁶ Ein weiteres kostimulierendes Molekül der $CD28$ Familie ist ICOS mit seinem Liganden ICOSL, welcher auf aktivierten DCs, Monozyten und B-Zellen exprimiert wird.⁹⁷ Der inhibitorische Rezeptor CTLA-4 hat eine 20-mal höhere Bindungsaffinität an B7 als $CD28$ und wirkt hemmend auf die T-Zell-Proliferation und Differenzierung.⁹⁸

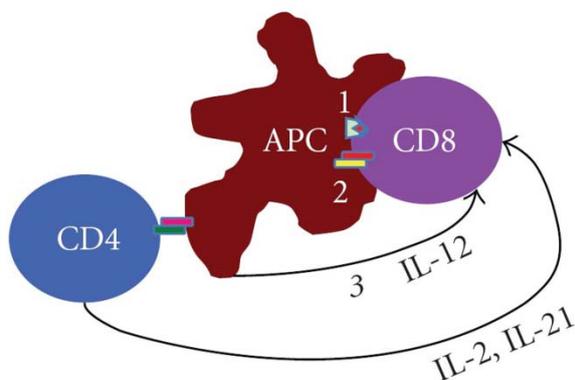


Abb. 5: Rolle der $CD4^+$ -T-Zelle bei der Kostimulation.⁹⁹ $CD8^+$ -T-Zellen, welche Antigene auf APCs erkennen, können nur in Anwesenheit von $CD4^+$ -T-Zellen aktiviert werden, die gleichzeitig an dieselbe Zelle gebunden sind. Diese Ko-Aktivierung passiert überwiegend durch $CD4^+$ -T-Effektorzellen. Sie erkennen Antigene auf APCs und produzieren vermehrt IL-2. Die APCs bewirken eine Stimulation der $CD8^+$ -T-Zellen mittel MHC-Molekülen (1) und ebenfalls via $CD80/CD86$, welches an $CD28$ der T-Zelle bindet (2). Außerdem produziert die APC IL-12 (3).

Bleiben die kostimulierenden Moleküle und Zytokine bei einer Antigen-Erkennung des TCR aus, so wird die T-Zelle nicht aktiviert und geht in einen inaktivierten Zustand über.¹⁰⁰ Aktivierte T-Zellen entwickeln sich innerhalb von mehreren Tagen unter IL-2 zu T-Effektorzellen. Die so entstandenen Effektorzellen können in lymphatischen

Keimzentren mit B-Zellen in Interaktion treten oder die lymphatischen Organe verlassen und ihre Funktion im peripheren Gewebe aufnehmen. T-Effektorzellen sind nicht mehr auf eine zusätzliche Kostimulation angewiesen und können direkt durch ihr spezifisches Antigen aktiviert werden.¹⁰¹

1.5 Die Gattung *Yersinia*

Yersinien gehören zu der Familie der Enterobakterien. Sie sind fakultativ anaerobe, gram-negative Stäbchenbakterien mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 27-30°C.¹⁰² Zu den elf bekannten *Yersinia*-Spezies gehören die für Nagetiere und Menschen pathogenen *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. *Y. pestis* ist der Erreger der Pest und die beiden Spezies *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* Verursacher der Yersiniose. Die enterale Yersiniose kann sich beim Menschen in drei verschiedenen Formen manifestieren: (1) Enteritis mit wässrigen Durchfällen, abdominellen Schmerzen, Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen; (2) terminale Ileitis oder mesenterialer Lymphadenitis mit Symptomen einer Pseudoappendizitis; (3) Septikämie mit Abszedierung von Milz und Leber, Pneumonie, Meningitis und Endokarditis.¹⁰³ Normalerweise ist die Infektion selbstlimitierend und nur in seltenen Fällen kommt es zu einer systemischen Manifestation, wie postinfektiöse reaktive Arthritis, Erythema nodosum, Uveitis, Iritis, Glomerulonephritis, Myokarditis oder Sepsis.^{104, 105} Während *Y. pestis* durch Flöhe, Kot, Speichel und Eiter übertragen wird, werden *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* über verunreinigtes Wasser und Nahrungsmittel aufgenommen. Gemeinsam haben alle drei Arten ihre Affinität zu lymphatischen Gewebe und die Fähigkeit, der unspezifischen Immunantwort und Tötung durch Phagozyten zu entkommen. Elektronenmikroskopie und zellbiologische Untersuchungen zeigten, dass *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* überwiegend extrazelluläre Erreger sind.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

1.5.1 Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica*

Die Bakterien gelangen üblicherweise über kontaminiertes Essen oder Wasser in den Körper. Die Infektion des Darmes erfolgt im Ileum über die M-Zellen (microfold cells) der Peyer-Plaques.^{109, 110} Die Yersinien können sich lokal ausbreiten und erreichen hohe Keimzahlen in den Peyer-Plaques sowie in regionalen Lymphknoten.

Y. enterocolitica besitzt verschiedene Gene für Virulenzfaktoren, welche auf dem Bakterienchromosom¹¹¹ oder auf dem 70-kb virulenten Plasmid pYV (Plasmid Yersinia Virulence)¹¹²⁻¹¹⁵ lokalisiert sind. Diese Virulenzfaktoren machen es dem Bakterium möglich, im lymphatischen Gewebe zu überleben und sich zu vermehren. Tab. 1 und 2 geben einen Überblick über die verschiedenen Pathogenitätsfaktoren.

Tab. 1: Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren von enteropathogenen Yersinia-Spezies

Faktor	Funktion
Ail	Vermittelt die Adhäsion und Invasion der Epithelzellen und Serumresistenz. ¹¹⁶⁻¹¹⁸
Inv	Invasin ist ein Adhäsion, welches durch die Bindung an Integrine den Transport der Bakterie durch die M-Zelle ermöglicht. Es ermöglicht das Eindringen in Epithelzellen und IL-8-Sekretion. ¹¹⁹⁻¹²⁷
Myf	Fibrillae könnte als ein Kolonisationsfaktor und somit bei der Entwicklung von Diarrhoe eine Rolle spielen. ¹²⁸
SodA	Die Superoxiddismutase (Sod) ist ein Enzym, welches exogene oxidative Radikale von Phagozyten unschädlich macht. Es befähigt die Bakterien, Leber und Milz zu kolonisieren, jedoch nicht die Peyer-Plaques. ¹²⁹
Yst	Hitzestabiles Enterotoxin, stimuliert die Guanylatzyklase intestinaler Epithelzellen und führt zu Diarrhoe. ¹³⁰⁻¹³²
HPI	HPI kodiert das extrazelluläre Siderophore Yersiniabactin (Ybt). Es ermöglicht den Bakterien, sich unter Eisenmangel zu vermehren. Ybt sorgt möglicherweise für eine Immunsuppression von B- und T-Zellen, MF und Granulozyten. Gene für die Ybt-Synthese, -Transport und -Regulation sind in HPI gebündelt. ¹³³⁻¹³⁵

Tab. 2: Plasmid kodierte Pathogenitätsfaktoren von enteropathogenen *Yersinia*-Spezies

Faktor	Funktion
YopE	Zytokin, das als GAP (GTPase aktivierendes Protein) auf Proteine der Rho-Familie wirkt. Blockt Phagozytose und trennt Aktinfilamente. ¹³⁶⁻¹³⁹
YopH	Phosphotyrosin-Phosphatase, dephosphoryliert fokale Adhäsionsmoleküle von Neutrophilen und MF. Ist für über 50% der antiphagozytischen Aktivität von Yersinien verantwortlich. Unterdrückt T- und B-Zell-Aktivierung und den oxidativen Burst der MF. ¹⁴⁰⁻¹⁴⁵
YopO (YpkA)	Serin-Threonin-Kinase wird von G-Aktin aktiviert und bewirkt die Autophosphorylierung von Serin-Proteinen. Trennt Aktinfilamente und interagiert mit RhoA und Rac1. ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸
YopM	Sehr saures Protein, enthält Leucin-reiche Wiederholungen (LRRs). Es gelangt zu dem Zellkern mittels Vesikel-vermittelten Transports. ¹⁴⁹⁻¹⁵²
YopP	Cysteinprotease, interagiert mit Mitgliedern der Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und IK β -Kinase. Die MAPK und NF- κ B Signalwege werden unterbrochen, was zu verminderter Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und der Induktion von Apoptose in MF und DCs führt. ¹⁵³⁻¹⁵⁸
YopT	Zerstörung von Aktin-Stressfaser durch Modifikation von RhoA, welches sich von der Plasmamembran löst und als monomeres Protein im Zytosol anfällt. ¹⁵⁹⁻¹⁶¹
YadA	Vermittelt die Haftung an Epithelzellen und Phagozyten. Bindet an Kollagen, Fibronectin und Laminin. Es schützt <i>Y. enterocolitica</i> gegen die Elimination durch Granulozyten und Lyse mittels Komplementfaktoren durch die Bindung von Faktor H. ¹⁶²⁻¹⁶⁵
LcrV	Verhindert die Synthese von TNF und IFN- γ und unterdrückt die Chemotaxis von Neutrophilen. Induziert die IL-10 Produktion in MF. ¹⁶⁶⁻¹⁶⁸

1.5.2 Typ III Sekretionssystem (TTSS) von *Y. enterocolitica*

Mittels des TTSS sind gramnegative Bakterien in der Lage, Effektorproteine direkt in das Zytosol der Wirtszelle einzubringen.¹⁶⁹ Diese Proteine können Prozesse in der Wirtszelle zum Vorteil des Bakteriums verändern. Bis heute sind 20 verschiedene TTSS aus pflanzlichen und tierischen Pathogenen identifiziert.¹⁷⁰ Das pYV codiert für

die Yop Virionen, welche virulente Proteine (Yops) und das Typ III Sekretionsapparat (Ysc) enthalten.¹⁷¹

Wenn Yersinien mit eukaryotischen Zellen in Kontakt kommen, bilden sie spritzenähnliche Organellen an ihrer Oberfläche aus. Diese Organellen heißen Ysc Injektosomen und sind Proteinpumpen, welche sich über die zwei Bakterienmembranen und die Schicht aus Peptidoglykanen erstrecken (siehe Abb. 6). Das gesamte Injektosom besteht aus 27 Proteinen. Die zehn Proteine im inneren Teil des Bakteriums ähneln dem Aufbau des Flagellums, was auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hinweist. Der externe Teil ist eine homomultimerische ringförmige Struktur, mit einer zentralen Pore von ca. 50 Å.^{172, 173} Das Injektosom endet mit einer 60-80 nm langen und 6-7 nm weiten Nadel, deren Länge genetisch festgelegt ist.¹⁷⁴ Die zur Sekretion durch das Injektosom vorgesehenen Yops haben keine klassische Signalsequenz.¹⁷⁵ Allerdings ist für die Sekretion ein Minimum von 15 Aminosäurerückständen an dem NH₂-terminalen Ende der Yops notwendig.^{176, 177} Einige Yops haben individuelle Chaperone, sogenannte Syc-Proteine.

Bei dem Kontakt mit einer eukaryotischen Zelle bindet das Bakterium mittels des Adhäsins YadA an Integrine auf der Zelloberfläche. Der Sekretionskanal des Injektosoms öffnet sich und Yops werden ausgeschüttet. Es gibt zwei Kategorien von Yop-Proteinen: Intrazelluläre Effektoren und Translokatoren, welche die Effektoren in das Zytosol der eukaryotischen Zelle einschleusen. Die Translokatoren (YopB, YopD, LcrV) formen eine Pore in der eukaryotischen Zellmembran von 16-23 Å. Sechs Effektor-Yops wurden bereits beschrieben (YopE, YopH, YopM, YopJ/P, YopO/YpkA, YopT). YopH ist eine starke Phosphotyrosin-Phosphatase, die antiphagozytisch wirkt, indem sie fokale Adhäsionsproteine der Wirtszelle dephosphoryliert und somit die Erkennung durch Phagozyten verhindert.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ YopE und YopT inaktivieren GTPase kontrollierte Zytoskelettbewegungen und tragen zur antiphagozytischen Wirkung bei.^{181, 182} YopP wirkt antiinflammatorisch, indem es die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren blockiert, außerdem induziert es Apoptose in MF und DCs. In DCs leitet YopP die Apoptose hauptsächlich durch Inaktivierung der MAPKs p38 und c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) ein. Dagegen führt in MF die Inaktivierung des Transkripti-

onsfaktor NF- κ B und die daraus resultierende verminderte Synthese von antiapoptischen Faktoren zum Zelltod.¹⁸³ Weniger ist über die Kinasen YopO/YpkA und YopM bekannt (siehe Tab. 2).

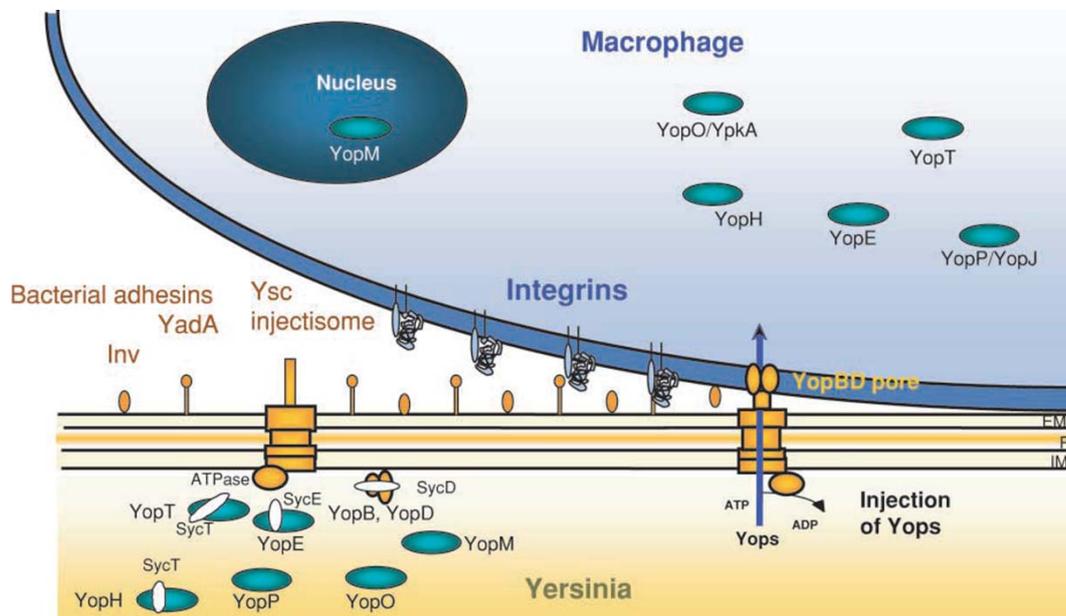


Abb. 6: Struktur des Injektosoms und Injektion von Yops in die Zielzelle.¹⁷¹ Gibt man Yersinien bei 37°C in ein reiches Umfeld, wird das Ysc-Injektosom aufgebaut und ein Vorrat an Yop-Proteinen wird synthetisiert. Während ihrer intrabakteriellen Phase werden einige Yops mit ihrem spezifischen Syc-Chaperon versehen. Bei Kontakt mit einer eukaryotischen Zielzelle interagieren die Adhäsine YadA oder Inv mit den Integrinen und das Bakterium bindet an die Zelloberfläche. Anschließend öffnen die Sekretionskanäle und Yops werden exportiert. YopB und YopD formen eine Pore in der Zielzellmembran und die Effektor-Yops werden in die eukaryotische Zelle injiziert. YopM wandert in den Zellkern. EM = Außenmembran, P = Peptidoglycan, IM = Plasmamembran

1.5.3 Die Immunantwort auf *Y. enterocolitica*

Y. enterocolitica sind enteroinvasive Erreger, welche von spezialisierten follikelassoziierten Epithelzellen in den Peyer-Plaques, den M-Zellen, aufgenommen werden.^{109, 184} M-Zellen exponieren β 1-Integrine an ihrer apikalen Oberfläche, an welche das Protein Invasin der Yersinien binden kann.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ M-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Übermittlung von Antigenen aus dem Darmlumen zum lymphatischen Gewebe der

Schleimhaut. Sie nehmen über ihre apikale Seite aus dem Darmlumen Makromolekül, Bakterien, Viren sowie Parasiten auf und geben diese direkt an Zellen des adaptiven Immunsystems weiter.¹⁸⁸ Das Eindringen von Yersinien über diesen Weg hat Vor- und Nachteile. Einerseits nutzen die Yersinien die M-Zellen als Struktur für die Invasion von lymphatischem Gewebe und ihre weitere Ausbreitung. Andererseits wird das Immunsystem durch das Eindringen der Bakterien unmittelbar aktiviert und es kann eine effektive Abwehr eingeleitet werden.

Einen Tag nach der M-Zell-Invasion durch *Y. enterocolitica* finden sich kleine Mikroabszesse aus Granulozyten und extrazellulär lokalisierten Yersinien in den Peyer-Plaques.^{106, 189} Yersinien haben effiziente Mechanismen, wie das Membranprotein YadA und Yop-Effektorproteine, entwickelt, um die angeborene Abwehr des Wirtes zu umgehen. Yersinien zeigen eine gewisse Resistenz gegenüber Phagozytose durch MF^{190, 191} und Granulozyten^{143, 162, 192}. Nach ihrer Replikation in den Peyer-Plaques verteilen sich die Bakterien entlang der Lymphbahnen und möglicherweise auch über den Blutweg in die mesenterischen Lymphknoten, Milz, Leber, Lunge und periphere Lymphknoten.¹⁰⁹ Die adaptive Immunantwort spielt eine Schlüsselrolle in der Beseitigung einer Yersinien-Infektion. Es ist bereits demonstriert worden, dass eine Infektion mit Yersinien zu einer starken T-Zell-Antwort, mit Aktivierung und Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, führt.^{31, 193-198} Mäuse mit unzulänglichen T-Zellen sind unfähig, Yersinien zu kontrollieren, und entwickeln eine progressive und fatale Infektion.¹⁹³ Ein Transfer von yersinienspezifischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in nicht-immune Mäuse übermittelt eine beständige Resistenz gegenüber der normalerweise letalen Yersinien-Infektion.¹⁹⁴ Diese protektiven CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen produzieren die Zytokine IFN- γ und IL-2, aber nicht IL-4 oder IL-10. Es kann demnach angenommen werden, dass T_h1-Zellen, oder IFN- γ produzierende CTLs bei einer Yersinien-Infektion eine schützende Wirkung haben.^{189, 194, 195, 199} T_h1-Zellen produzieren hauptsächlich IFN- γ , welches erwiesenermaßen MF aktivieren kann, die dann Pathogenen phagozytieren können.

Die Rolle von Zytokinen in der Yersinien-Infektion wurde umfangreich an Mausstämmen untersucht, die relative anfällig (z.B. BALB/c) oder resistent (z.B. C57BL/6) ge-

genüber einer Yersinien-Infektion sind.²⁰⁰ Ein Grund für diese unterschiedliche Anfälligkeit von Mäusen liegt in ihrer Fähigkeit, die T_h1-Antwort und IFN- γ -Produktion effektiv in Gang zu setzen.²⁰¹ Yersinienresistente C57BL/6-Mäuse konnten anfällig für Yersinien gemacht werden, indem man IFN- γ *in vivo* mit monoklonalen Antikörpern neutralisierte. Andersherum konnten BALB/c-Mäuse durch Behandlung mit IFN- γ resistent gemacht werden.²⁰⁰ Diese Versuche zeigen, dass IFN- γ ein zentrales protektives Zytokin während einer Yersinien-Infektion ist. An Mausstämmen mit einem fehlerhaften Zytokin oder Zytokinrezeptor ließ sich ebenfalls die Wichtigkeit der Zytokine TNF, IL-12, IL-18 und IFN- γ zeigen.^{31, 195, 199, 202}

Im Gegensatz zu den T-Zellen erkennen freie Antikörper das Membranprotein YadA von *Y. enterocolitica*.²⁰³ Bei einer Infektion mit *Y. enterocolitica* wirkten Antikörper gegen LcrV, F1-Antigen und YopD protektiv. Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass wahrscheinlich unterschiedliche Antigene in der zellulären und humoralen Immunantwort eine Rolle spielen.

1.5.4 *Yersinia enterocolitica* als Träger von Impfstoffen

Viele Antigene besitzen nur eine geringe immunogene Aktivität und müssen deshalb mit Adjuvantien oder Trägern versehen werden. Die Bildung einer antigenspezifischen Immunität erfordert die Aktivierung von T-Zellen, was durch Adjuvantien als Trägerstoffe oder Lebendträger erreicht werden kann. Abgeschwächte enteropathogene Yersinien, welche heterologe Antigene exprimieren, werden als vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung oraler Lebendimpfstoffe gesehen.^{204, 205}

Yersinien sind überwiegend extrazelluläre Erreger, können jedoch über ihr Typ III Sekretionssystem (TTSS) Antigene in APCs einbringen. Es existieren verschiedene Ansätze für die Entwicklung von Impfstoffen aus *Y. enterocolitica*. Immunstimulierende Proteine von *Y. enterocolitica* wie Invasin werden an Mikropartikel gebunden und könnten als Adjuvantien für Impfstoffe genutzt werden.^{126, 206} Buhler *et al.* impf-

ten Mäuse mit einem, auf Mikropartikel gebrachten, Hybridprotein aus Invasin sowie Ovalbumin und konnten sowohl eine CD4- als auch eine CD8-T-Zell-Antwort induzieren.²⁰⁷ Ein ähnlicher Ansatz ist, Proteine wie Invasin als Zusatz für andere Lebendimpfstoffe zu verwenden. Critchley-Thorne *et al.* zeigten, dass die Co-Expression von Invasin, OVA und Lysteriolysin-O in *E. coli*, bei oraler Lebendimpfung, zu einer effektiven Abtötung von OVA exprimierenden Tumorzellen führte.²⁰⁸ Suzuki *et al.* beschrieben die effektive Nutzung einer, Invasin exprimierenden, nichtinvasiven *Shigella*-Mutante als Lebendimpfstoff gegen *Shigella*-Infektion.²⁰⁹

Andererseits können lebende, veränderte Yersinien mit ihrem TTSS als Antigentransporter fungieren. Um abgeschwächte Yersinien-Stämme herzustellen, werden Gene von virulenten Proteinen wie Yops, Invasine, SodA und Irp-1 ausgeknockt. Dies erfordert allerdings genaue Kenntnisse über die Funktionen unterschiedlicher Yops und ihrer Rolle im TTSS (siehe Tab 1 und 2). Eine verstärkte CD8-T-Zell-Antwort wurde bei einer oralen Infektion mit einer *Y. enterocolitica* YopP-Mutante gezeigt.²¹⁰ Außerdem konnten Trülzsch *et al.* eine Immunisierung gegen *L. monocytogenes* mit einer *Y. enterocolitica* YopP Mutante erreichen.²⁰⁵ Abgeschwächte *Y. enterocolitica* Stämme wurde in verschiedenen Versuchen als Träger von Lebendimpfstoffen im Maus-Infektionsmodell getestet. Sory *et al.* benutzten den niedrig virulenten *Y. enterocolitica* Stamm O:9, um eine Immunisierung gegen Cholera Toxin B und *Trypanosoma cruzi* zu erreichen.^{211, 212} Lotter *et al.* verwendeten eine *Y. enterocolitica* *irp1*-Mutante als oralen Impfstoff gegen Amöbiasis.²¹³ Gundel *et al.* erreichten eine Abwehr gegen das Masernvirus, bei der Immunisierung mit der veränderten *Y. enterocolitica* *sodA*-Mutante.²¹⁴ Nichtsdestotrotz sind die veränderten Yersinien-Stämme größtenteils noch zu virulent, als dass sie als Lebendimpfstoffe genutzt werden könnten. Es sind noch weitere Studien nötig, um zu untersuchen, welche der Yop-Proteine die beste Immunstimulation bei geringer Virulenz bewirken. Zusätzlich ist es nötig, die Immunmodulation von DCs durch die Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica* zu untersuchen, da DCs eine wichtige Rolle in der T-Zell-Aktivierung einnehmen. Hierdurch soll eine Basis geschaffen werden, auf welcher Yersinia-Mutanten als Träger für Lebendimpfstoffe ausgewählt werden können.

1.6 Die Milz

Die Milz ist ein bekapseltes Organ im linken Oberbauch. In der Maus beträgt das Normalgewicht der Milz ca. 0,1 g. Das Grundgerüst der Milz besteht aus retikulärem Bindegewebe und wird in weiße und rote Pulpa (RP) eingeteilt. Als weiße Pulpa (WP) wird die Gesamtheit des lymphatischen Gewebes der Milz zusammengefasst.

Das Blut gelangt über die in den Trabekeln (Balken) verlaufenden großen Arterien in die Milz. Nach Verlassen der Trabekel treten die Arterien in die Milzpulpa als Zentralarterien ein. Hier sind sie von einer Manschette aus lymphatischem Gewebe, der PALS, umgeben. Die PALS sind die T-Zell-Areale der Milz und bestehen aus Lymphozyten und Zellen des Grundretikulums (siehe Abb. 7).

Um die weitere Aufzweigungen des arteriellen Gefäßbaums sind die LF der Milz angeordnet. Der Follikel besteht aus Keimzentrum (GC), Mantelzone und Marginalzone (MZ). Entsprechend sind diese von einer zentral oder parazentral verlaufenden kleinen Arterie durchzogen. Sobald diese Arterie den Follikel verlassen hat, zweigt sie sich pinselartig in zahlreiche Arteriolen auf. An die Pinselararterien schließen sich die Hülsenkapillaren an. Die Hülsen bestehen aus MF und DCs, die mit ihren Ausläufern in das Gefäß hineinragen und Antigene aus dem Blut aufnehmen, welche sie wiederum in der T- und B-Zell-Zone des LF präsentieren.

Als rote Pulpa wird die Gesamtheit der mit roten Blutkörperchen gefüllten Sinus und des Pulpamaschenwerks bezeichnet. Sie macht 75% des Gewebes aus und ist für den Abbau von Erythrozyten und Thrombozyten zuständig. Nachdem sich die Arterien verzweigt haben, fließt das Blut aus offenen Kapillaren in die Pulpastränge. Hier befindet sich der Übergang zwischen roter und weißer Pulpa, welcher auch parafollikuläre Zone (PFZ) genannt wird. Die Pulpastränge bestehen aus einem Netz aus Fibrozyten und retikulären Fasern. Hier sitzen zahlreiche Plasmazellen und MF, die alte Thrombozyten und Erythrozyten erkennen und abbauen. Anschließend werden die Blutbestandteile wieder von dünnwandigen, großlumigen Sinus aufgenommen und in die Venen zurück geleitet. ^{215, 216}

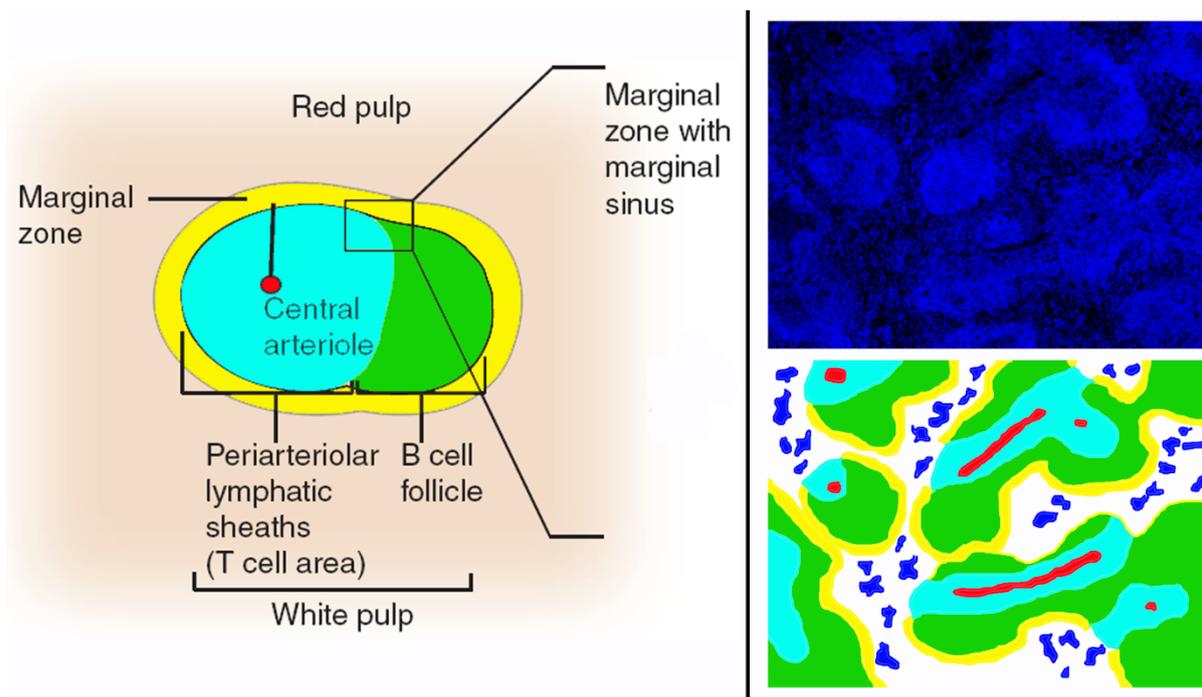


Abb. 7: Die Struktur des lymphatischen Gewebes in der Milz.²¹⁷ Das linke Bild zeigt die Vergrößerung eines kleinen Kompartiments einer Milz. Es zeigt die Zonen der WP um die Zentralarteriole. Um die Zentralarteriole angeordnet ist die PALS oder T-Zell-Zone. T-Lymphozyten und antigenbeladene DCs kommen hier zusammen. Die Follikel bestehen zum größten Teil aus B-Lymphozyten. In sekundären Follikeln ist die GC umgeben von einer Krone aus B-Lymphozyten. Die Follikel sind umgeben von der sogenannten MZ. In der kleinen Zone der WP fließt Blut, beladen mit Lymphozyten und Antigenen, von der Trabekelarterie in die Zentralarteriole. Von dieser Zentralarteriole gehen kleinere Arterien ab, welche dann in der PFZ enden. Die PFZ umgibt wiederum die MZ. Zellen und Antigene gelangen durch den blutgefüllten Raum in die perifollikuläre Zone. Die rechte Seite zeigt einen Querschnitt durch mehrere Follikel. Dapi-Zellkernfärbung oben und schematische Darstellung der Follikelzonen unten. Gelb = Marginalzone, Rot = Zentralarteriole, Hellblau = PALS, Grün = B-Zell-Zone, Dunkelblau = Venöse Sinus.

1.6.1 Verteilung der Immunzellen in der Milz

Die T-Zellen befinden sich größtenteils in der PALS und einige wenige in der MZ der Follikel. Die MZ liegt der PALS und den LF locker an und ist die Eintrittspforte in die weiße Pulpa. In der MZ befinden sich MF und unreife DCs. Auch wenige T- und B-Zellen sowie Plasma und Gedächtniszellen sind dort zu finden. MF und DCs filtern

Krankheitserreger, lösliche Antigene und Antigen-Antikörper-Komplexe aus dem Blut. Sobald eine DC durch ein Antigen aktiviert wurde, wandert sie in die T-Zell-Zone ein, um dort das Antigen zu präsentieren.^{218, 219} In den Follikel befinden sich überwiegend B-Zellen in verschiedenen Reifestadien. Da B-Zellen nicht nur durch den Kontakt mit einem Antigen aktiviert werden, sondern ebenfalls durch T_H -Zellen aktiviert werden müssen, wandern sie beim Eintritt in die Milz durch die T-Zell-Zone, wo sie mit diesen Zellen in Kontakt kommen. Das GC des Follikels enthält aktivierte B-Zellen, die verschiedene Stadien von Differenzierung und Proliferation durchlaufen. Zusätzlich kommen follikuläre dendritische Zellen (FDCs), T_H2 -Zellen und MF vor. In der MZ befinden sich ruhende kleinere B-Zellen.²²⁰

Die B- und T-Lymphozyten finden ihre Region über ihre charakteristische Zusammensetzung von Rezeptoren für spezielle Chemokine. Eine große Rolle für die Ausbildung der unterschiedlichen Zellzonen in sekundären lymphatischen Organen spielen die TNF-Familie und die Lymphotoxine (LT). TNF ist unter anderem an der Organisation der weißen Pulpa und der Differenzierung der FDCs beteiligt.²²¹ LT triggern die Differenzierung von Mesenchymzellen, Stromazellen und DCs und lösen die homöostatische Chemokinproduktion aus.²²² Knockout-Mäuse für verschiedene Chemokine der TNF-Familie und LT zeigen eine gestörte oder fehlende Ausbildung von Lymphknoten, Peyer-Plaques und Milz.²²³

Homöostatische Chemokine wie CCL19 und 21 und CXCL13 ermöglichen die Einwanderung von APCs, T- und B-Zellen in sekundäre lymphatische Organe. DCs und Stromazellen exprimieren unterschiedliche Chemokine in den Zell-Zonen der lymphatischen Organe. In der T-Zell-Zone bewirken CCL 19 und 21 eine T-Zell Ansammlung. Das in der B-Zell-Zone exprimierte CXCL13 lockt B-Zellen an.²²⁴ Die Bewegung reifer B-Lymphozyten an die Grenze der T-Zell-Zone, wo sie mit aktivierten T-Zellen interagieren, hängt von ihrer jeweiligen Empfindlichkeit gegenüber den Chemokinen CCR7 und CXCR5 ab.²²⁵

1.7 Zielsetzung

DCs spielen durch ihre Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren eine essentielle Rolle in der Immunabwehr von *Y. enterocolitica*. Sie gehören zu den APCs, welche sowohl in der Peripherie des Körpers als auch in zentralen lymphatischen Organen vorhanden sind. Sie nehmen ständig Antigene aus ihrer Umgebung auf, um sie anschließend auf ihrer Zelloberfläche mittels MHC-II Molekülen T-Zellen zu präsentieren. Aoshi und Muraille *et al.* haben bereits eine DC-Migration von der MZ in die T-Zell-Zone während einer Infektion mit *L. monocytogenes* gezeigt.^{218, 219}

Zahlreiche Zellmediatoren spielen in der Immunabwehr von *Y. enterocolitica* eine Rolle. TLRs sind wichtige membranständige Rezeptoren, welche pathogen assoziierte Muster auf Bakterien (PAMPs) erkennen und eine Immunantwort auslösen können.^{226, 227} Sie werden von verschiedenen Immunzellen, darunter auch DCs, exprimiert und lösen bei ihrer Aktivierung eine Reihe von Signalkaskaden aus, an welchen die Adaptermoleküle MyD88 und TRIF beteiligt sind.²²⁸ Versuche der Arbeitsgruppe, in denen die Anzahl der DC mittels Durchflusszytometrie (FACS) während einer Yersinien-Infektion gemessen wurde, zeigten eine Reduktion von DCs in der Milz von C57BL/6 und MyD88^{-/-}-Mäusen.²²⁹ In TLR2x4^{-/-} und TRIF^{-/-}-Mäusen war diese Reduktion nur in geringem Maße vorhanden.

Yersinien sind überwiegend extrazelluläre Bakterien. Sie sind jedoch in der Lage mittels eines Adhäsins (YadA) an eukaryotische Zellen zu binden und mit Hilfe eines Injektionsapparates Effektorproteine (Yops) in die Zelle zu injizieren. Dadurch wird die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren gehemmt und eine verminderte Phagozytose, Antigenprozessierung, Zytokinproduktion und Differenzierung der DCs bewirkt.²³⁰⁻²³² Außerdem kann die Apoptose in MF und DCs eingeleitet werden.¹⁸³ Aidkins *et al.* konnten bereits eine Interaktion von *Y. enterocolitica* und DCs *in vitro* fluoreszenzmikroskopisch darstellen.

In dieser Arbeit sollte histologisch die Verteilung und Anzahl von DCs innerhalb der Milzstrukturen vor und während der Infektion mit *Y. enterocolitica* untersucht werden.

Ein weiteres Ziel war es, festzustellen, ob sich die durchflusszytometrischen Ergebnisse histologisch durch unterschiedlich starke Abszessbildung und verringerte Anzahl von DCs in der Milz während einer Infektion mit *Y. enterocolitica* widerspiegeln. Außerdem soll *in vivo* der Kontakt zwischen *Y. enterocolitica* und DCs fluoreszenzmikroskopisch abgebildet und eine mögliche intrazelluläre Lokalisation sowie Kolo­kalisierung von Yersinien untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

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

- C57BL/6JolaHsd (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln)
- 129SvxC57BL/6JolaHsd (Eigene Zucht)
- TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-} doppelt-defiziente Mäuse (C57BL/6x129/Sv-Hintergrund) tragen sowohl im TLR2 als auch im TLR4 eine Mutation. Dieser Mauslinie ist nicht in der Lage, über TLR2 und TLR4 Signale weiterzugeben.²²⁶
- TRIF^{-/-} defiziente Mäuse wurden in den Laboratorien von Bruce Beutler (La Jolla, San Diego, USA) generiert. Die Mäuse sind nicht in der Lage, über den TRIF-Weg Signale weiterzugeben.²²⁷
- MyD88^{-/-} defiziente Mäuse weisen kein intrazelluläres Adaptermolekül MyD88 mehr auf. Diesen Mäusen ist es nicht möglich, MyD88-Signale weiterzuleiten.²²⁸

Die Mäuse wurden vom Züchter gekauft und hatten fünf bis sieben 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. Die Untersuchung der Tiere fand durchschnittlich im Alter von 6-12 Wochen statt. 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.

2.1.2 Bakterienstamm

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

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

<u>Chemikalie/Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
1,4% PFA-Fixierlösung	Sigma-Adrich, Steinheim
Aceton	Merck, Darmstadt
BSA	Biomol, Hamburg
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenyindole)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin-G Lösung 0,5%	Merck, Darmstadt
Esel Serum	Dianova, Hamburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
FCS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fluoprep	BioMérieux, Nürtingen
Formamid	Ambion, UK
Glycerin	MerckKGaA, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Mowiol	Calbiochem, Bad Soden
NaCl	Merck, Darmstadt
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺	PAA Laboratories, Österreich
Ratten Serum	Dianova, Hamburg
Rotihistol	Roth, Karlsruhe
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
NGS (Ziegen Serum)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.4 Medien und Puffer

<u>Medium</u>	<u>Herstellung</u>
PBS	4 mM KH ₂ PO 16 mM Na ₂ HPO ₄ 115 mM NaCl
Anti-FcγRII/III mAb (FC-Block)	Eigene Produktion, hybridoma supernatant 2.4G2 Zelllinie
Hybridisierungspuffer	72ml 5M NaCl 8ml 1M Tris 240ml Aqua dest

2.1.5 Antikörper

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Antikörper

Epitop Anti-	Format	Klon	Isotyp	Hersteller
Maus CD4 (L3 T4)	Unkonjugiert	RM4-5	Ratte IgG2ak	BD Pharmingen™
Maus CD8a	Unkonjugiert	53-6.7	Ratte IgG2ak	BD Pharmingen™
Maus CD11c	Biotin	HL3	Hamster IgG1	BD Pharmingen™
Maus Wa-vital		polyklonal	Kaninchen IgG	Eigene Herstellung
Maus CD16/32	Purifiziert	2.4G2	Ratte IgG2ak	Eigene Herstellung
Ratte IgG (H+L)	Unkonjugiert	polyklonal	Ziege IgG, Fab-Fragment	Dianova

Tab. 4: Übersicht der Sekundärantikörper

Fluorochrome	Format	Antikörper	Hersteller
Cy-5	Konjugiert, Fab-Fragment	Esel anti Ratte IgG (H+L)	Jackson Immuno Research
Cy-2	konjugiert	Esel anti Ratte IgG (H+L)	Jackson Immuno Research
Alexa-Fluor 594	konjugiert	Ziege anti Maus IgG	Molecular Probes, Invitrogen
Alexa-Fluor 488	Konjugiert, Fab-Fragment	Ziege anti Kaninchen IgG	Molecular Probes, Invitrogen

2.1.6 FISH Sondenmix

<u>Sondenmix</u>	<u>Hersteller</u>
16S rRNA-Sonde, Yersinien spezifisch ²³³	biomers, Ulm

2.1.7 Kitsysteme

<u>Kitsystem</u>	<u>Hersteller</u>
Streptavidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, USA

2.1.8 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Modell</u>	<u>Hersteller</u>
ApoTome		Carl Zeiss, Jena
Autoklav	5075 ELV	Tuttnauer Systec
Cryotom	Leica CM 3000	Leica Microsystems, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200 M	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzbeleuchtung	X-Cite Series 120	Exfo, Kanada
Injektionskammer		Vetter, Ammerbuch
Handdispenser	Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Konfokalmikroskop	TCS SP2	Leica Microsystems, Wetzlar
Mauskäfig (IVC)	Sealsafe 1284	Techniplast, Hohenpeßen
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop	BX51	Olympus, Hamburg
Pipetten		Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Sterilisator	Heraeus 6120	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Sterilwerkbank	HERA Safe	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

Vortexer	VortexGenie2	Scientific Industrie, USA
Hybridisierungsöfen		Hybaid, Heidelberg
Wasserbad	1083	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

2.1.9 Plastik- und Verbrauchsmaterialien

<u>Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Hersteller</u>
Deckgläser 24 x 60 mm	Langenbrinck, Emmendingen
Einwegpipetten	BD Biosciences, Heidelberg
Whatman Filterpapier	Millipore, Eschborn
Fixo gum	Marabuwerke, Tamm
Glaseinsatz 70mm	Leica Biosystems, Nussloch
Glaskasten und Färbegestell	Schubert & Weiss, München
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz
Handschuhe (Latex)	Ansell Healthcare, Belgien
Handschuhe (Nitril)	Kimberly Clark, USA
Histo Tubes	Carl Roth, Karlsruhe
Immersionsöl	Carl Zeiss, Jena
Microtome Blades C35	Pmf Medical AG, Köln
PAP Pen	Abcam plc, UK
Parafilm	Bemis, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Pipettenspitzen 200µl	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 200 - 1000µl	Ratiolab, Dreieich
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Superfrost Plus Objektträger 76 x 26 mm	Langenbrinck, Emmendingen
Tissue Tek O.C.T. TM Compound	Sakura Finetek, Staufen

2.1.10 Software

<u>Programm</u>	<u>Hersteller</u>
Adobe Photoshop	Adobe Systems, Irland
Axio Vision Release 4.7.2.	Carl Zeiss, Jena
Cell [^] B	Olympus, Hamburg
Graph Pad Prism 4.0	GraphPad Software, USA
Leica Confocal Software	Leica Microsystems, Wetzlar
Microsoft Excel	Microsoft, USA

2.2 Methoden

2.2.1 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 intravenös injiziert.

2.2.2 Entnahme der Milz

Die Mäuse wurden mittels CO₂-Gases und anschließender zervikaler Dislokation gemäß den geltenden Tierschutzregeln getötet. Danach wurde die Milz aseptisch entnommen und das Gewicht mittels Feinwaage bestimmt. Anschließend wurde die Milz in Tissue Tek eingebettet und bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Herstellung und Fixierung von Gefrierschnitten

Das Gewebe wurde in der Cryokammer auf -20°C gebracht, die Objektisch- und Kammertemperatur auf 18 und 22°C eingestellt. Der Gewebeblock wurde mit Tissue Tek auf dem Objektisch fixiert, eingespannt und 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf den Objektträger (OT) aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit Aceton bei -20°C in einer Glasküvette 10 Minuten lang fixiert, anschließend mit Fixogum umrandet und erneut über Nacht trocknen gelassen. Die Färbung wurde am darauf folgenden Tag durchgeführt.

2.2.4 Färbung

Der gesamte Ablauf wurde in einer feuchten Kammer und lichtgeschützt durchgeführt. Es wurden 100 µl Reagenz pro Schnitt verwendet. Der Primärantikörper wurde auf den Schnitt auf der OT-Innenseite gegeben, der Isotyp auf den Schnitt auf der OT-Außenseite. Bei den Waschschrritten wurden die OT alle 5 Minuten in eine, mit frischem PBS gefüllte, Glasküvette gestellt.

2.2.5 CD11c und DAPI

Die Schnitte wurden 15 min in PBS und 0,25% BSA in einer Glasküvette rehydriert. Als erstes wurde der Biotin-Block mit dem Biotin Blocking Kit durchgeführt. Dabei wurden 1-2 Tropfen Streptavidin auf jeden Schnitt gegeben und 25 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschrtritt 2 x 5 min. Anschließend wurden 1-2 Tropfen Biotin auf jeden Schnitt gegeben und 25 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschrtritt 3 x 5 min. Dann wurde mit FC-Block, 10% FCS und 5% NGS für 30 min bei RT inkubiert. Das Reagenz wurde nur abgekippt und nicht gewaschen.

Anschließend wurden Primärantikörper und Isotyp-Kontrolle aufgetragen und in einer feuchten Kammer 30 min inkubiert. Der Primärantikörper, Biotin-Conj. Hamster Anti-Mouse CD11c (HL3) und die Isotyp-Kontrolle, Biotin-Conj. Anti-Hamster IgG1, wurden 1:100 (10µg/ml) in Zellkultur Mouse FC-Block und 10% FCS verdünnt.

Es folgte ein Waschschrift 3 x 5 min.

Als nächstes wurde der Sekundärantikörper Streptavidin Alexa Fluor 594 conj. aufgetragen. Der AK wurde vorher 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Mit der Verdünnung 1:2000 (1µg/ml) in Zellkultur PBS und 10% FCS, wurde in einer feuchten Kammer 30 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschrift 3 x 5 min.

Nun wurde die DAPI-Kernfärbung aufgetragen. Mit der Verdünnung 1:100 wurde 5 min gefärbt (Stocklösung 1mg/ml PBS bei -20°C).

Es folgte ein Waschschrift 4 x 5 min.

Zuletzt wurden mehrere Tropfen des Eindeckmittels Mowiol auf jeden Schnitt (75µl) gegeben und das Deckglas aufgelegt. Nach dem Eindeckeln konnten die Schnitte bei 4°C einige Wochen aufbewahrt werden.

2.2.6 CD11c, WA-vital und DAPI

Die Schnitte wurden 15 min in PBS und 0,25% BSA in einer Glasküvette rehydriert.

Als erstes wurde mit FC-Block, 10% FCS und 5% NGS für 30 min bei RT inkubiert.

Das Reagenz wurde nur abgekippt und nicht gewaschen.

Anschließend wurden Primärantikörper und Isotyp-Kontrolle aufgetragen und in feuchter Kammer 30 min inkubiert. Der Primärantikörper WA-vital wurde 1:200 (ca. 5µg/ml) in Zellkultur PBS, 10% FCS und 5% NGS verdünnt. Die Isotyp-Kontrolle Rabbit-IgG wurde 1:5000 (5µg/ml) in Zellkultur PBS, 10% FCS und 5% NGS verdünnt. Es folgte ein Waschschrift 3 x 5 min.

Danach wurde der Sekundärantikörper, Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment of goat-anti-rabbit IgG(H&L), mit der Verdünnung 1:2000 (1µg/ml) in Zellkultur PBS, 10%

FCS und 5% NGS aufgetragen und in einer feuchten Kammer 30 min bei RT inkubiert. Der AK wurde vorher 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Es folgte ein Waschschrift 3 x 5 min.

Nun wurde der Biotin-Block mit dem Biotin Blocking Kit durchgeführt. Dazu wurden 1-2 Tropfen Streptavidin auf jeden Schnitt gegeben und 25 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschrift 2 x 5 min. Anschließend wurden 1-2 Tropfen Biotin auf jeden Schnitt gegeben und 25 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschrift 3 x 5 min.

Anschließend wurden Primärantikörper und Isotyp-Kontrolle aufgetragen und in feuchter Kammer 30 min inkubiert. Der Primärantikörper, Biotin-Conj. Hamster Anti-Mouse CD11c (HL3) und die Isotyp-Kontrolle, Biotin-Conj. Anti-Hamster IgG1 wurden 1:100 (10µg/ml) in FC-Block und 10% FCS verdünnt.

Es folgte ein Waschschrift 3 x 5 min.

Als nächstes wurde der Sekundärantikörper Streptavidin Alexa Fluor 594 conj. mit der Verdünnung 1:2000 (1µg/ml) in Zellkultur PBS und 10% FCS aufgetragen und in einer feuchten Kammer 30 min bei RT inkubiert. Der AK wurde vorher 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift 3 x 5 min.

Nun wurde die DAPI-Kernfärbung aufgetragen. Mit der Verdünnung 1:100 wurde 5 min gefärbt (Stocklösung 1mg/ml PBS bei -20°C).

Es folgte ein Waschschrift 4 x 5 min.

Zuletzt wurden mehrere Tropfen des Eindeckmittels Mowiol auf jeden Schnitt (75µl) gegeben und das Deckglas aufgelegt. Nach dem Eindeckeln konnten die Schnitte bei 4°C einige Wochen aufbewahrt werden.

2.2.7 Hämatoxylin – Eosin – Färbung (HE-Färbung)

Die fertigen Schnitte wurden 30 min bei RT getrocknet, anschließend mit Aceton bei -20°C in einer Glasküvette 10 min fixiert und bei RT getrocknet. Es folgte die Rehydrierung in PBS für 5 min und weitere Färbeschritte: Hämatoxylin 30 s; Aqua bidest 30 s; Bläuen in Leitungswasser nach Sicht 2 min; 0,5% Eosin-G und 1 Tropfen

100% Essigsäure 5-20 s schwenken; kurze Spülung in Aqua bidest; 70% Ethanol 1 min; 70% Ethanol 30 s; 90% Ethanol 30 s; 96% Ethanol 30 s; 100% Ethanol 1 min; 100% Ethanol 1 min; Rotihistol I 5 min; Rotihistol II 5 min; Rotihistol III 5 min. Zum Schluss wurde das Präparat in Entellan eingedeckelt und 2 h unter dem Abzug getrocknet.

2.2.8 Fluoreszenz – in – situ – Hybridisierung (FISH)

Die über Nacht getrockneten Schnitte wurden 10 min in 1,4% PFA-Lösung fixiert und mit dem PAP Pen umrundet. Pro Schnitt wurde 50 µl Reagenz benötigt.

Als Erstes wurde eine Hybridisierungskammer angefertigt. Dazu wurde Filterpapier gefaltet und in 50ml Flacon Tubes gesteckt.

Anschließend wurde pro Kammer 2000 µl Hybridisierungspuffer, 20% Formamid und 10% SDS auf das Filterpapier geben. Nun wurde der Sondenmix, in Verdünnung mit dem Hybridisierungspuffer 1:10 (50µg/ml), aufgetragen. Der OT wurde auf das Filterpapier gelegt und bei 46°C 90 min hybridisiert.

Das Wasserbad wurde auf 46°C aufgeheizt, der 10fach Waschpuffer, aus NaCl, 30% 1M Tris und 0,15% SDS, 1:10 verdünnt und darin vorgewärmt. Nach Ende der Hybridisierung wurden die OT entfernt und im Wasserbad 15 min mit dem Waschpuffer inkubiert. Dann wurde in einem Flacon-Tube mit PBS gespült und die Schnitte getrocknet.

Als nächstes wurde die DAPI-Kernfärbung (Verdünnung 1:100) aufgetragen und 5 min gefärbt. Anschließend wurde in einem Flacon-Tube mit PBS gespült und die Schnitte trocknen gelassen. Zuletzt wurden die Schnitte mit Fluoprep abgedeckt.

2.2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Es wurde das Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 200 M von Carl Zeiss und die zugehörige Software Axio Vision Release 4.7.2. verwendet.

Die einzelnen Schnitte wurden, je nach Färbungen, mit den zugehörigen Wellenlängen fotografiert und die Ebenen übereinander gelegt. Dabei wurde die Belichtungszeit auf den mit dem Antikörper gefärbten Schnitt angepasst. Zu jeder Färbung und jedem Objektiv wurde eine optimale Belichtungszeit festgelegt und alle Schnitte unter gleichen Bedingungen fotografiert. Vergleichend wurde mit derselben Belichtungszeit und demselben Objektiv die Isotyp-Kontrolle fotografiert.

Tab. 5: Emissionsmaxima der Fluorochrome (modifiziert)²³⁴⁻²³⁶

Eingesetzte Fluorochrome	Excitation Laser (nm)	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
Cy-2	492	490	510
Cy-5	650	650	670
Alexa Fluor 594	590	594	617
Alexa Fluor 488	495	488	519

2.2.10 Lichtmikroskopie von H&E-Schnitten

Es wurde das Mikroskop BX51 von Olympus und die zugehörige Software Cell[^]B verwendet. Die Abszessbildung wurde unter Durchsicht aller Schnitte einer jeweiligen Knockout-Maus beurteilt und exemplarisch die aussagekräftigsten Bereiche in 10 x und 20 x Vergrößerung fotografiert.

Für die Umfang- und Flächen-Messung wurden pro Maus-Typ fünf Milzschnitte von unterschiedlichen Mäusen untersucht. Der gesamte Milzschnitt wurde in 5 x Vergrö-

berung fotografiert und gespeichert. Das Programm Cell[^]B ermöglichte es, die Größe und den Umfang der Abszesse zu berechnen. Die Abszesse wurden manuell umrandet und die Werte gleichzeitig in eine Excel-Tabelle übertragen.

2.2.11 Bildbearbeitung mit Photoshop

Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm Photoshop von Adobe. Die Fotografien der einzelnen Färbungen eines Bildausschnitts wurden zunächst separat bearbeitet und anschließend in Ebenen übereinander gelegt. Die Bearbeitung erfolgte mit den Funktionen „Image → Adjustments → Levels“ und „Image → Adjustments → Brightness/Contrast“. Fotos von Isotyp und Antikörper wurden einander zugeordnet und gemeinsam bearbeitet. Dabei mussten Färbung und Vergrößerung übereinstimmen. Die Bilder der Isotypkontrolle wurden so bearbeitet, dass kein Signal mehr zu erkennen war. Anschließend konnten die gleichen Einstellungen auf die Bilder mit dem Antikörper angewandt werden. So wurden nur signifikante Signale herausgestellt. Außerdem konnte mittels der DAPI-Färbung Strukturen der Milz erkannt und als „Follikel“ oder „Abszesse“ markiert werden.

2.2.12 Auswertung Abszesse mit dem Statistischen Programm

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 $p < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**), oder $p < 0.005$ (***) ist.

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung der DCs in der Milz im Verlauf einer Infektion mit *Y. enterocolitica*

Durch ihre Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren spielen, DCs eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr von *Y. enterocolitica*. DCs gehören zu den APCs, welche in der MZ der Milz lokalisiert sind und dort Antigene aus dem Blut heraus filtern, um sie anschließend auf ihrer Zelloberfläche mittels MHC-II-Molekülen T-Zellen zu präsentieren. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits eine Migration von DCs während einer Infektion mit *L. monocytogenes* von der MZ in die T-Zell-Zone gezeigt.^{218, 219}

Das Ziel folgender Untersuchung war, die Lokalisation von DCs in der Milz während einer Infektion mit *Y. enterocolitica* zu zeigen. Es sollte untersucht werden, wo sich die DCs während verschiedener Zeitpunkte der Infektion befinden und ob eine Migration in die T-Zell-Zone bzw. PALS stattfindet. Ein weiterer Zweck war es, festzustellen, ob ein bestimmter Ort für die Abszessebildung in der Milz existiert. Dazu wurden C57BL/6-Mäuse mit 5×10^4 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und zu den Zeitpunkten einen und drei Tage nach der Infektion Cryoschnitte der Milz angefertigt. Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden CD11c⁺-DCs und Yersinien mit einem spezifischen Antikörper markiert und mittels Sekundärantikörper gefärbt. Um die Struktur der Milz beurteilen zu können, wurde eine Kernfärbung (DAPI) angewendet. Als Kontrolle wurden C57BL/6-Mäuse nur mit PBS behandelt.

In der Milz PBS-behandelter Mäusen befindet sich CD11c⁺-DCs überwiegend in der MZ und PFZ sowie in geringerer Anzahl in der PALS bzw. T-Zell-Region (siehe Abb. 8). Die LF sind als zelldichte Gebiete durch die Kernfärbung gut zu erkennen. Die den LF umgebenden zellärmeren Gebiete sind die MZ und weiter in der Peripherie die PFZ. Gefäße stellen sich als zellfreie Räume dar. Zur Struktur der Milz siehe Abb. 7 der Einleitung.

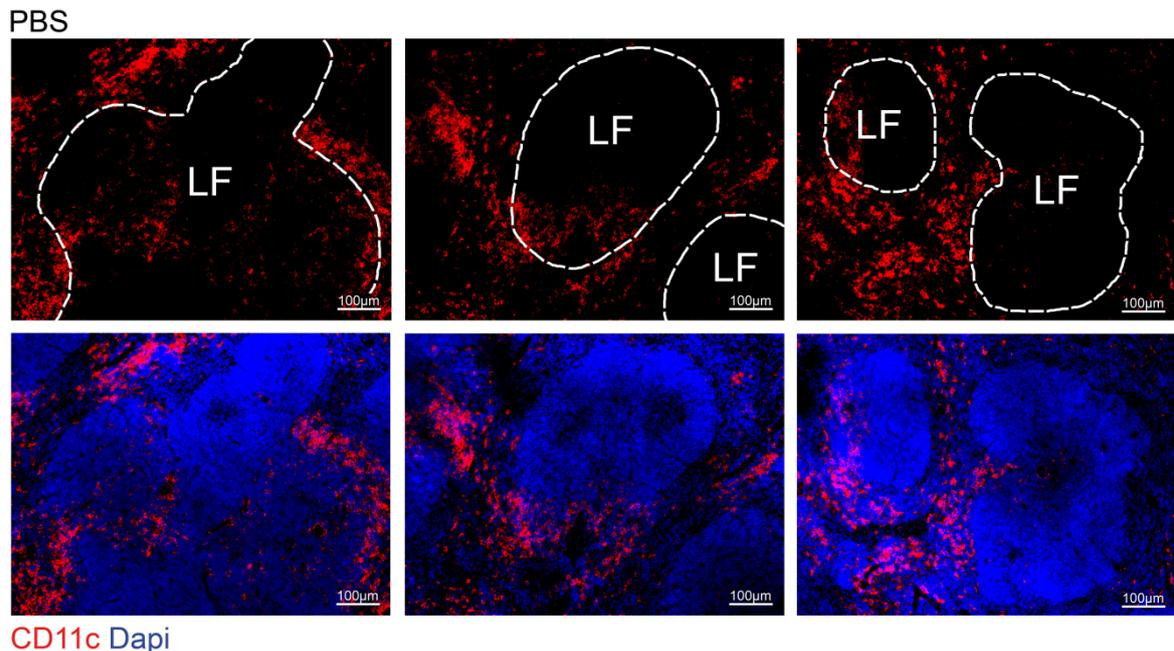
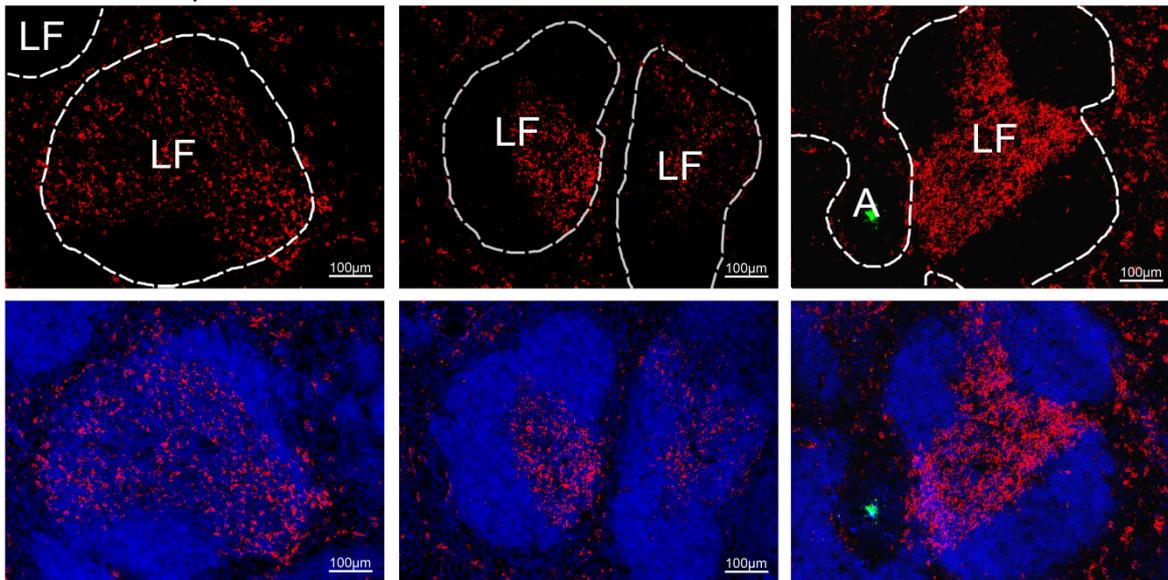


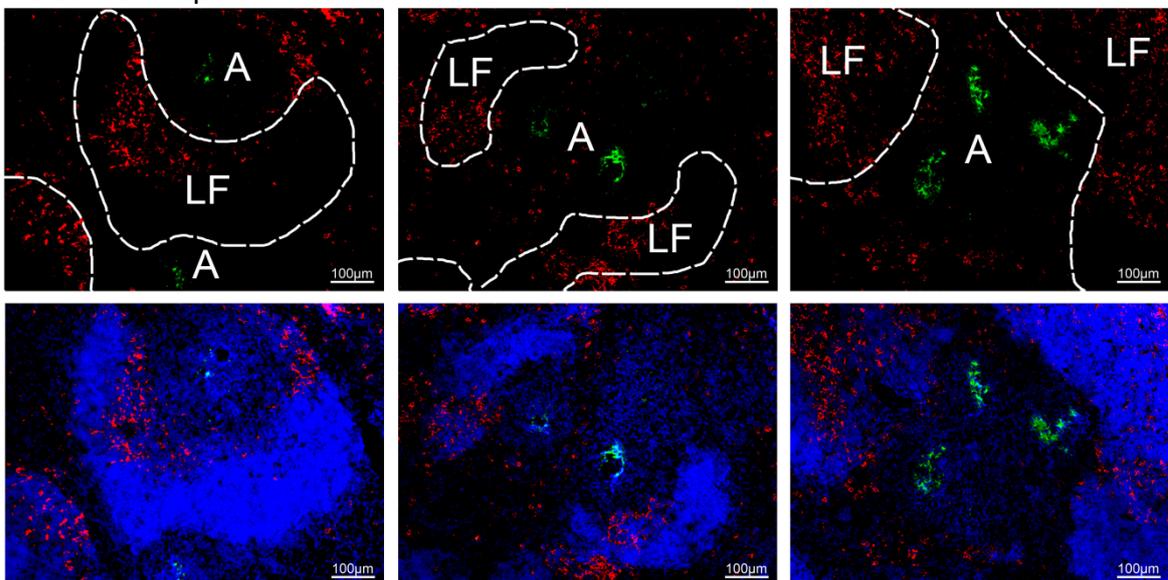
Abb. 8: **Die Verteilung von CD11c⁺-DCs einen Tag nach der Injektion von PBS.** C57BL/6-Mäusen wurde PBS injiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot und Zellkerne blau gefärbt. Beschriftung: LF = Lymphfollikel.

Einen Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* ist eine Veränderung bezüglich der Verteilung der CD11c⁺-DCs in der Milz zu erkennen. Diese befinden sich nun überwiegend in der PALS bzw. T-Zell-Region und nur in geringer Anzahl in der MZ und PFZ. Dies ist bei LF ohne Abszessbildung besonders eindrücklich zu erkennen (siehe Abb. 9). Die Anzahl der CD11c⁺-Zellen ist unverändert im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen. Schon am ersten Tag nach der Infektion findet eine Bildung von kleinen Abszessen statt. Betrachtet man die Lokalisation der Abszesse, befinden sich diese sowohl am Rand der LF in der MZ als auch in der PALS bzw. T-Zell-Region. In LF mit Yersinien-Befall geht die ursprüngliche Organisation der Zellen verloren und die CD11c⁺-DCs finden sich in verminderter Anzahl im verbleibenden Follikelgewebe und in der MZ und PFZ (vergleiche Abb. 9 und 10).

Ye 5×10^4 1 dpi

CD11c Dapi Wa-vital

Abb. 9: Die Verteilung von $CD11c^+$ -DCs einen Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. C57BL/6-Mäuse wurden mit 5×10^4 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden $CD11c^+$ -Zellen rot, Yersinien grün und Zellkerne blau gefärbt. Die CFU betrug $\log 6,32 \pm 0,34$. Beschriftung: LF = Lymphfollikel, A = Abszess

Ye 5×10^4 1 dpi

CD11c Dapi Wa-vital

Abb. 10: Die Verteilung von $CD11c^+$ -DCs einen Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. C57BL/6-Mäuse wurden mit 5×10^4 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden $CD11c^+$ -Zellen rot, Yersinien grün und Zellkerne blau gefärbt. Die CFU betrug $\log 6,32 \pm 0,34$. Beschriftung: LF = Lymphfollikel, A = Abszess.

Am dritten Tag nach der Yersinien-Infektion ist die gesamte Milz von Abszessen durchsetzt und die Follikelstrukturen nur noch ansatzweise erkennbar (siehe Abb. 11). Die Zahl der CD11c⁺-Zellen ist deutlich dezimiert und die DCs befinden sich zwischen Abszessen verstreut oder rund um kleinere Abszesse gruppiert.

Ye 5 x 10⁴ 3 dpi

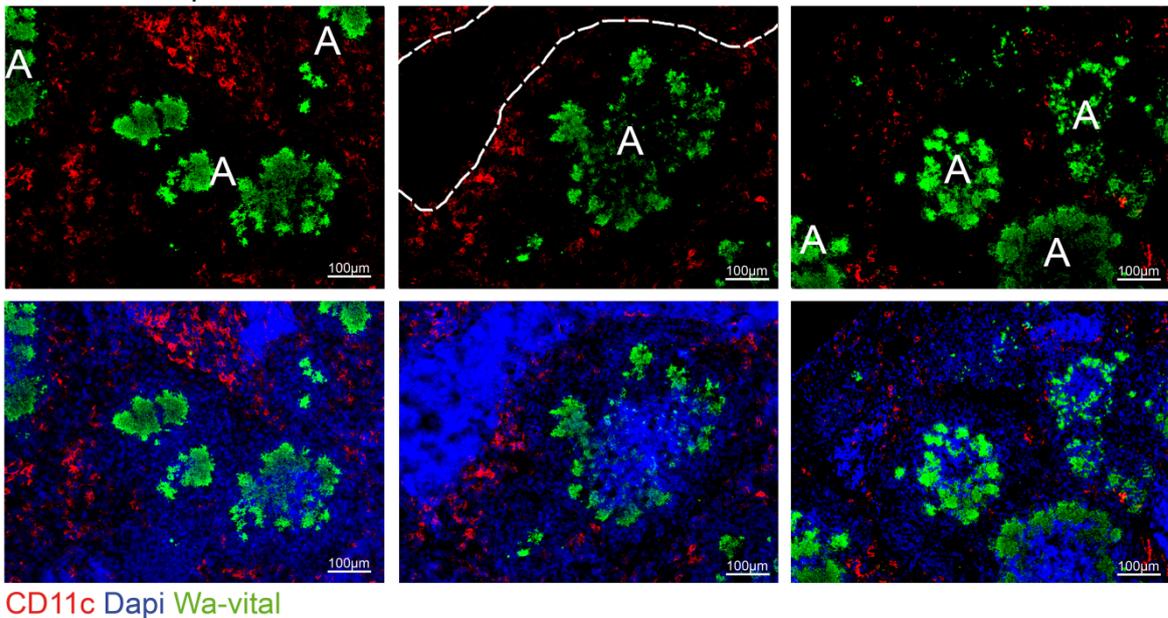


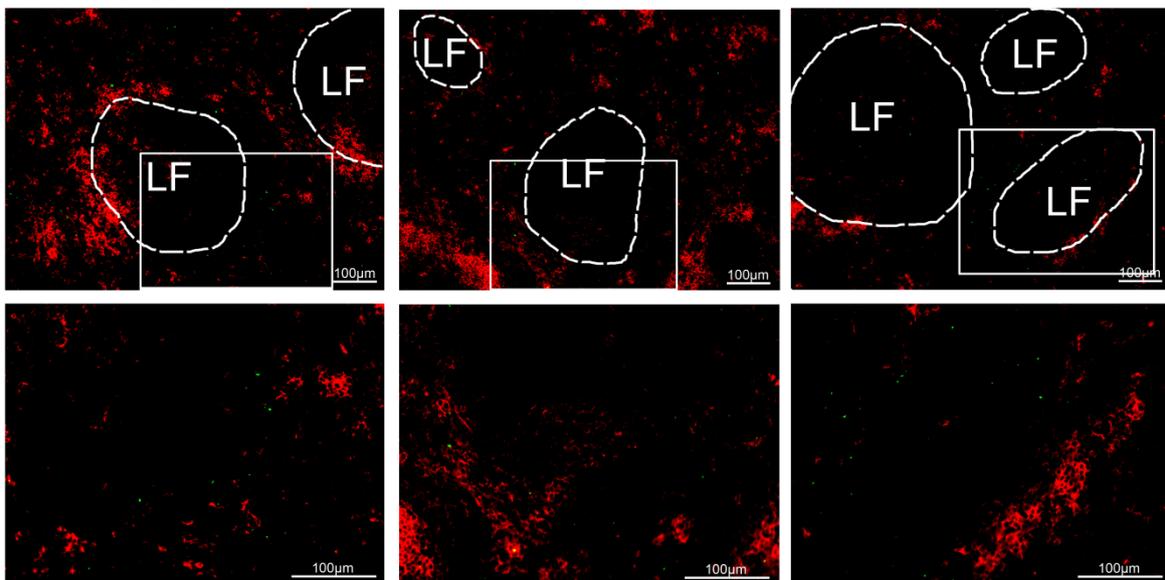
Abb. 11: Die Verteilung von CD11c⁺-DCs drei Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. C57BL/6-Mäuse wurden mit 5 x 10⁴ *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün und Zellkerne blau gefärbt. Die CFU betrug 7,72 ± 0,42. Beschriftung: LF = Lymphfollikel, A = Abszess.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Verteilung von DCs in der Milz im Verlauf einer Infektion mit *Y. enterocolitica* verändert. In der Milz PBS-behandelter Mäuse befinden sich DCs überwiegend in der MZ und PFZ und zu einem geringen Teil in der PALS- bzw. T-Zell-Region, wohingegen sich einen Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* die Verteilung genau umkehrt. Die DCs sind nun in der PALS zu finden und weniger in der MZ und PFZ. Eine typische Lokalisation der Abszesse konnte nicht festgestellt werden. Diese befinden sich einen Tag nach der Infektion sowohl in der MZ als auch in der PALS. Am dritten Tag nach der Infektion ist die Anzahl der DCs stark verringert und die Follikelstruktur durch ausgedehnte Abszesse weitgehend zerstört. Die DCs sind einzeln oder gruppiert zwischen den Abszessen verteilt.

3.2 Verteilung DCs in der Milz während früher Infektionszeitpunkte mit *Y. enterocolitica*

Bei den oben beschriebenen Untersuchungen 3.1 wurde eine Veränderung in der Lokalisation von DCs in der Milz am ersten Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* gesehen. In diesem Zusammenhang sollte nun der Zeitraum näher eingegrenzt werden, wann DCs von der MZ in die PALS übergehen. Außerdem sollte untersucht werden, ob Yersinien bei einer frühen Infektion fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar sind. Hierdurch erhoffte man sich, Hinweise auf ihren Eintrittsort und eine frühe Interaktionen mit DCs zu bekommen.

Ye 1×10^7 30 min



CD11c Wa-vital

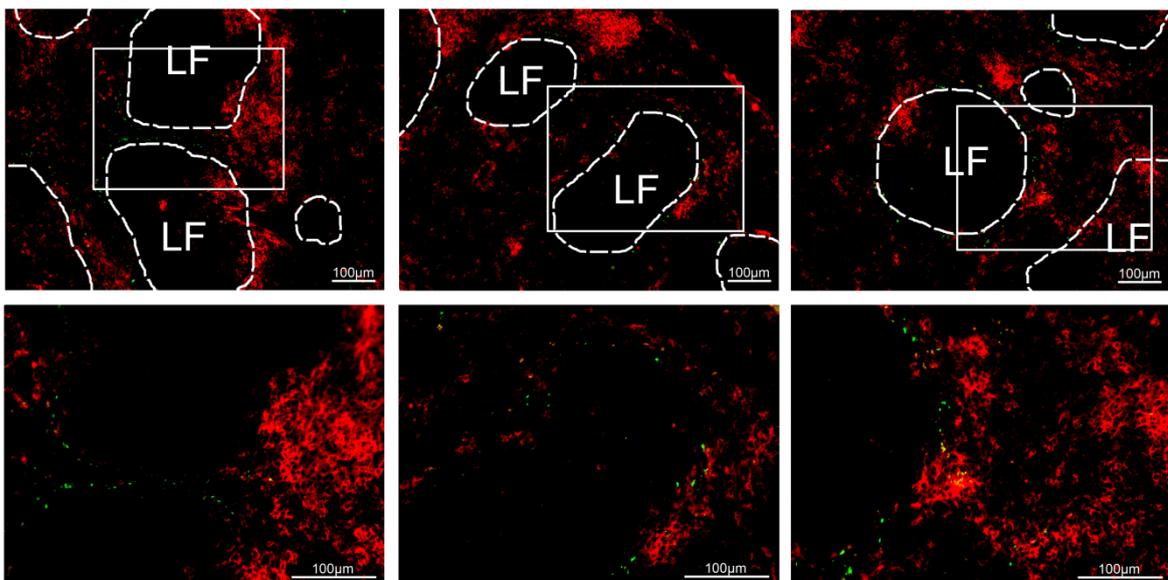
Abb. 12: Die Verteilung von $CD11c^+$ -DCs 30 Minuten nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. C57BL/6-Mäuse wurden mit 1×10^7 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden $CD11c^+$ -Zellen rot, Yersinien grün und Zellkerne blau gefärbt. Beschriftung: LF = Lymphfollikel. In der oberen Reihe sind Bildausschnitte in 10x Vergrößerung zu sehen, der Kasten markiert den Bildausschnitt der unteren Reihe in 20 x Vergrößerung.

Es wurden C57BL/6-Mäuse mit 1×10^7 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und zu den Zeitpunkten 30 Minuten, drei, sechs und 12 Stunden nach der Infektion Cryoschnitte der Milz angefertigt. Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden $CD11c^+$ -DCs und Yersinien mit spezifischen Antikörpern markiert und mittels Sekun-

därantikörpern gefärbt. Um die Struktur der Milz beurteilen zu können, wurde eine Kernfärbung (DAPI) angewendet.

Sowohl eine halbe Stunde als auch drei Stunden nach der Yersinien-Infektion befinden sich die $CD11c^+$ -DCs, wie auch bei PBS-behandelten Mäusen, überwiegend in der MZ und PFZ der LF. Die Anzahl der DCs ist zu diesen frühen Zeitpunkten der Infektion vergleichbar mit der Anzahl in PBS behandelten Mäusen. Es ist ein Saum von Bakterien um die LF ansatzweise schon nach 30 Minuten (siehe Abb. 12) und deutlich nach drei Stunden (siehe Abb. 13) zu sehen. Bei stärkerer Vergrößerung lassen sich schon nach 30 Minuten eine beträchtliche Anzahl von Yersinien in der MZ nachweisen (siehe Abb. 25). Es sind vorwiegend einzelnstehende Bakterien erkennbar, welche gleichmäßig um die LF angeordnet sind.

Ye 1×10^7 3 h

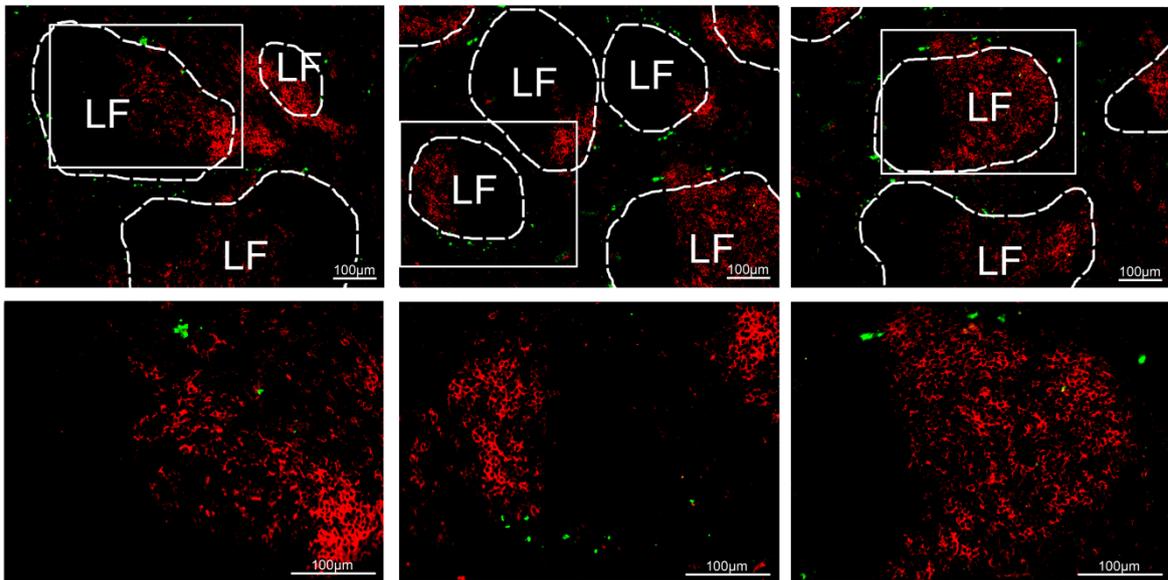


CD11c Wa-vital

Abb. 13: Die Verteilung von $CD11c^+$ -DCs drei Stunden nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. C57BL/6-Mäuse wurden mit 1×10^7 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden $CD11c^+$ -Zellen rot, Yersinien grün und Zellkerne blau gefärbt. Beschriftung: LF = Lymphfollikel. In der oberen Reihe sind Bildausschnitte in 10 x Vergrößerung zu sehen, der Kasten markiert den Bildausschnitt der unteren Reihe in 20 x Vergrößerung.

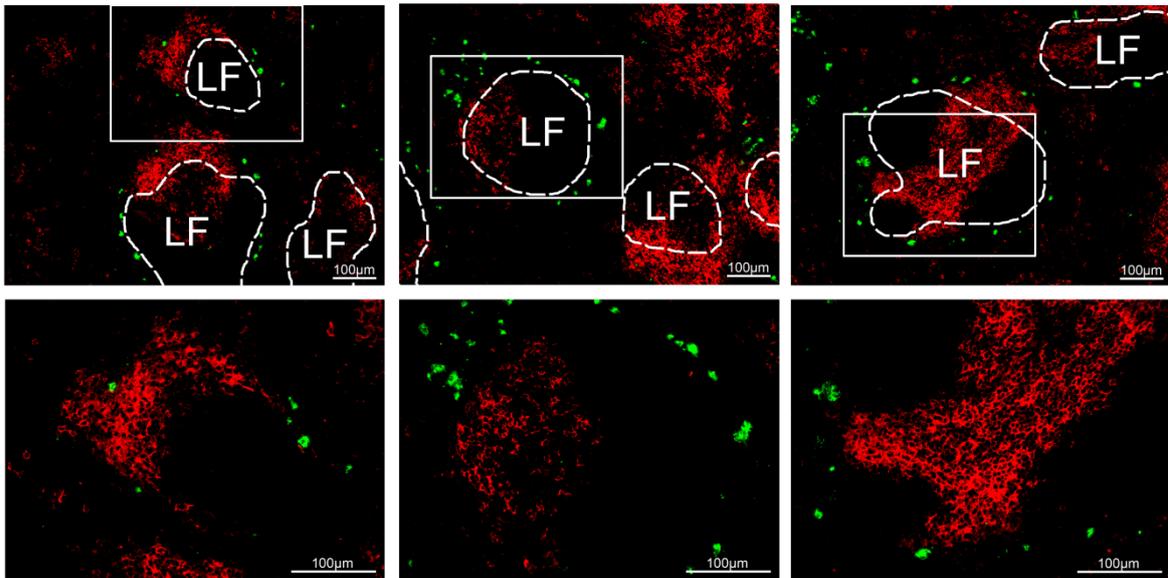
Eine Veränderung in der Verteilung der CD11c⁺-DCs in der Milz ist sechs Stunden nach der Infektion zu sehen (siehe Abb. 14 und 15). Die DCs befinden sich von diesem Zeitpunkt an überwiegend in der PALS bzw. T-Zell-Region und nur in geringer Anzahl in der MZ. Die Zahl der CD11c⁺-DCs ist nicht vermindert. Dagegen sind die Yersinien in größerer Anzahl um die LF angeordnet und in der MZ deutlich zu erkennen. Besonders 12 Stunden nach der Infektion sind hier größere Bakterienkolonien sichtbar (siehe Abb. 15). Die LF sind in ihrer Struktur unverändert und es sind zu diesem Zeitpunkt der Infektion noch keine Abszesse vorhanden.

Ye 1×10^7 6 h



CD11c Wa-vital

Abb. 14: Die Verteilung von CD11c⁺-DCs sechs Stunden nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. C57BL/6-Mäuse wurden mit 1×10^7 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün und Zellkerne blau gefärbt. Beschriftung: LF = Lymphfollikel. In der oberen Reihe sind Bildausschnitte in 10 x Vergrößerung zu sehen, der Kasten markiert den Bildausschnitt der unteren Reihe in 20 x Vergrößerung.

Ye 1 x 10⁷ 12 h

CD11c Wa-vital

Abb. 15: Die Verteilung von CD11c⁺-DCs 12 Stunden nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. C57BL/6-Mäuse wurden mit 1 x 10⁷ *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün und Zellkerne blau gefärbt. Beschriftung: LF = Lymphfollikel. In der oberen Reihe sind Bildausschnitte in 10 x Vergrößerung zu sehen, der Kasten markiert den Bildausschnitt der unteren Reihe in 20 x Vergrößerung.

Es wurde gezeigt, dass sich die Verteilung von DCs in der Milz sechs Stunden nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* verändert hat. Ein Vergleich der unterschiedlichen Infektionszeitpunkte ist in Abbildung 16 zu sehen. Die DCs sind bis drei Stunden nach der Infektion überwiegend in der MZ und PFZ lokalisiert. Nach sechs Stunden befinden sie sich zum Großteil in der PALS- bzw. T-Zell-Region. Yersinien sind zu allen gewählten Infektionszeitpunkten in steigender Anzahl in der MZ zu finden. In der MZ enden zahlreiche Arteriolen, welche von der Zentralarterie des LF und den Trabekelarterien gespeist werden (siehe Abb. 7). Die Bakterien gelangen also zuerst entlang des Blutweges in die MZ. Eine Interaktion kann hier vermutet werden, da sich die CD11c⁺-DCs bis drei Stunden nach der Infektion zusammen mit den Yersinien in der MZ der LF befinden. Auf die Frage der Interaktion wird in Punkt 3.4 näher eingegangen.

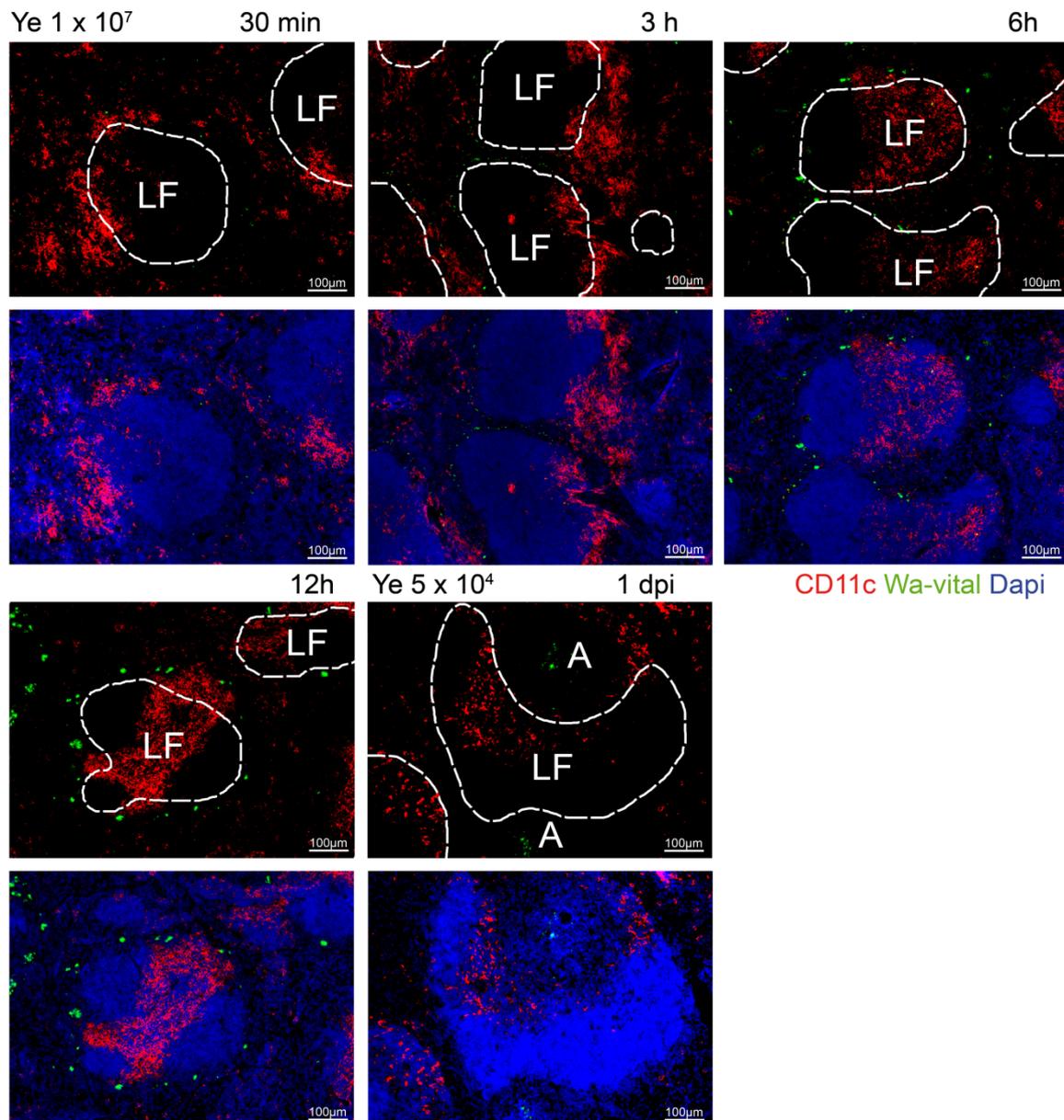


Abb. 16: Vergleich der Verteilung von $CD11c^+$ -DCs 30 min, 3 h, 6 h, 12 h und einen Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. C57BL/6-Mäuse wurden mit 1×10^7 (30 min, 3 h, 6 h, 12 h) und 5×10^4 (1 Tag) *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden $CD11c^+$ -Zellen rot, Yersinien grün und Zellkerne blau gefärbt. Beschriftung: LF = Lymphfollikel, A = Abszess.

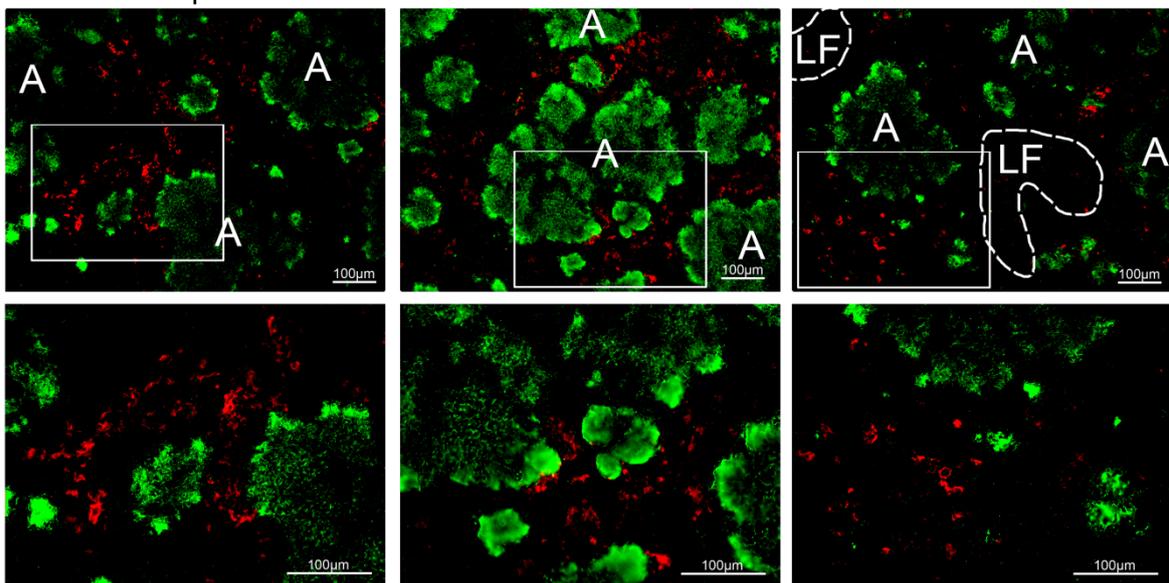
3.3 Vergleich der Abszessbildung und -lokalisierung in Wildtyp- und Knockout-Mäusen

Verschiedene Zellmediatoren sind wichtig für die Immunabwehr von *Y. enterocolitica*. Die am besten erforschte Gruppe unter ihnen sind die TLRs. Sie sind membranständige Rezeptoren, welche pathogen assoziierte Muster auf Bakterien (PAMPs) erkennen und eine Immunantwort einleiten können.^{226, 227} Eine Reihe von Immunzellen, darunter auch DCs, tragen TLRs auf ihrer Zelloberfläche. Bei ihrer Aktivierung wird eine Signalkaskade ausgelöst, an der die Adaptermoleküle MyD88 und TRIF beteiligt sind.²²⁸ Unsere Arbeitsgruppen hatte bereits die DC-Zellzahl in C57BL/6-, MyD88^{-/-}-, TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}- und TRIF^{-/-}-Mäusen während einer Yersinien-Infektion mittels FACS untersucht. Hierbei zeigte sich eine Reduktion der DCs in C57BL/6- und MyD88^{-/-}-Mäusen, jedoch nicht in TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}- und TRIF^{-/-}-Mäusen, am dritten Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Ziel war es nun, fest zu stellen, ob diese Ergebnisse sich histologisch durch unterschiedlich starke Abszessbildung in der Milz während einer Infektion mit *Y. enterocolitica* widerspiegeln und ob ein Rückgang der DCs bei entsprechenden Mäusen nachweisbar ist. Zusätzlich sollte untersucht werden, in welchen Strukturen der Milz eine Abszessbildung stattfindet und ob Abszesse an dem Ort der Einwanderung von Yersinien in der MZ oder innerhalb der LF entstehen.

Es wurden die Knockout-Mäuse MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-} und TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-} untersucht. Als Kontrolle dienten C57BL/6- und 129Sv-Mäuse (129SvxC57BL/6), da TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäuse auf einem C57BL/6x129SV-Hintergrund generiert wurden. Die Mäuse wurden mit *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert (Dosis siehe Tab. 6) und am dritten Tag nach der Infektion Cryoschnitte der Milz angefertigt. Zur Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-DCs und Yersinien mit spezifischen AK markiert und mittels Fluoreszenz Sekundäran-tikörpern gefärbt. Um die Struktur der Milz beurteilen zu können, wurde eine Kern-färbung (DAPI) angewendet. Mittels HE-Färbung wurden basophile Strukturen (Zell-kerne) blau gefärbt und acidophile Strukturen (Zellplasma) rot gefärbt. Außerdem wurden die Bakterienlast (CFU = Colony Forming Units) und das Milzgewicht be-

stimmt (siehe Tab. 6). Von C57BL/6-Mäusen wurde zusätzlich eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) der Cryoschnitte durchgeführt. Hierbei waren die Untersuchungszeitpunkte einen, zwei und drei Tage nach Infektion mit 5×10^4 *Y. enterocolitica* pYV⁺. Die FISH ist eine hoch sensitive und spezifische Methode, Teile des Genoms von Lebewesen nachzuweisen. Dabei bindet eine spezifische Gensonde an einen komplementären DNA- oder RNA-Strang und kann z.B. mittels Fluoreszenzfarbstoff direkt oder indirekt nachgewiesen werden. Für diese FISH wurde eine Yersinien-spezifische, direkt Fluoreszenz-markierte rRNA Sonde verwendet.²³³

Ye 5×10^4 3 dpi



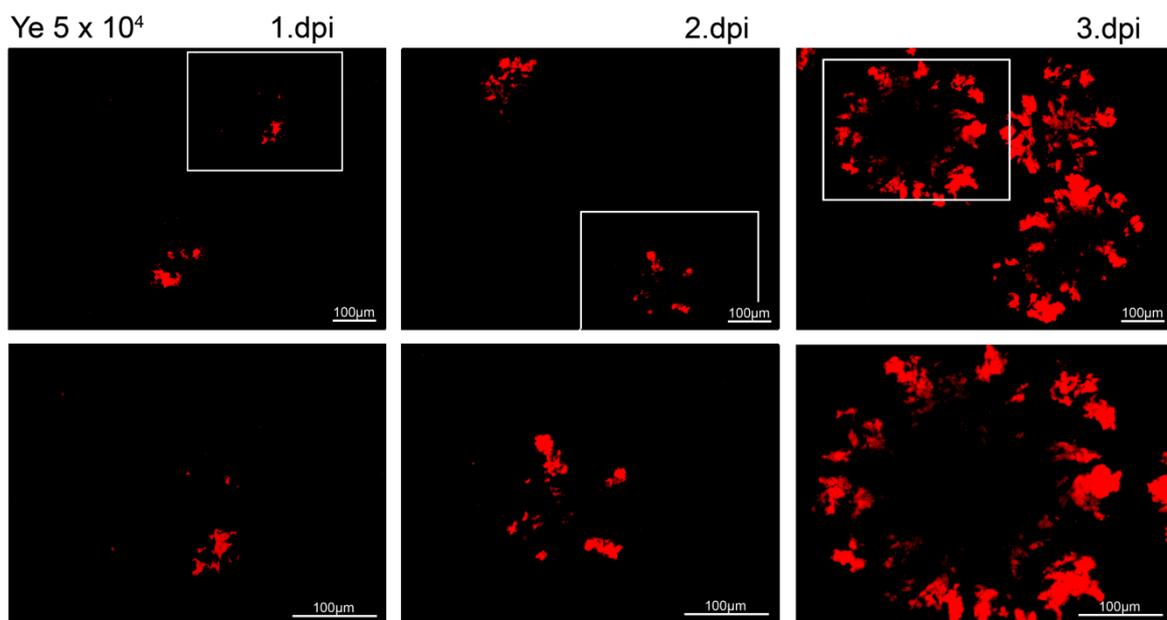
CD11c Wa-vital

Abb. 17: Die Abszessbildung in C57BL/6-Mäusen drei Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. C57BL/6-Mäuse wurden mit 5×10^4 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün gefärbt. Die CFU betrug $7,72 \pm 0,42$. Beschriftung: LF = Lymphfollikel, A = Abszess. In der oberen Reihe sind Bildausschnitte in 10 x Vergrößerung zu sehen, der Kasten markiert den Bildausschnitt der unteren Reihe in 20 x Vergrößerung.

Bei C57BL/6-Mäusen zeigt sich am dritten Tag nach der Infektion die gesamte Milz mit Abszessen durchsetzt. Die wölkchenförmigen Abszesse haben einen geringen Durchmesser, nehmen jedoch einen großen Teil der Milz ein (siehe Abb. 17). C57BL6-Mäuse haben die größte Anzahl an Abszessen pro Milz, welche aber einen vergleichsweise kleinen Durchmesser aufweisen (siehe Tab. 7). Das Zentrum großer Abszesse ist weniger stark gefärbt. Dort befindet sich Zelldetritus, der in der DAPI-

Färbung als Zellmaterial zu sehen ist (siehe Abb. 11). Einige wenige unvollständige Follikel sind erkennbar und die Zahl CD11c⁺-DCs ist erheblich dezimiert. Die CFU liegt bei log 7,72 und das Milzgewicht ist mit 0,25 g deutlich erhöht (normal 0,1 g).

Die FISH ist eine sehr spezifische Methode um *Y. enterocolitica* nachzuweisen. Anders als bei der Färbung mit Fluoreszenz-markiertem Antikörper ist keine unspezifische Bindung zu erwarten und es können kleinste Mengen von Bakterien sehr sensitiv erkannt werden. Mit der FISH lässt sich einen, zwei und drei Tage nach der Infektion die stetige Ausbreitung der Abszesse erkennen. Eine starke Zunahme der Abszessgröße ist vom zweiten auf den dritten Tag zu sehen. Am dritten Tag ist, wie auch in der Fluoreszenzfärbung, eine Abschwächung der Färbung zentral in den Abszessen zu sehen (siehe Abb. 18).

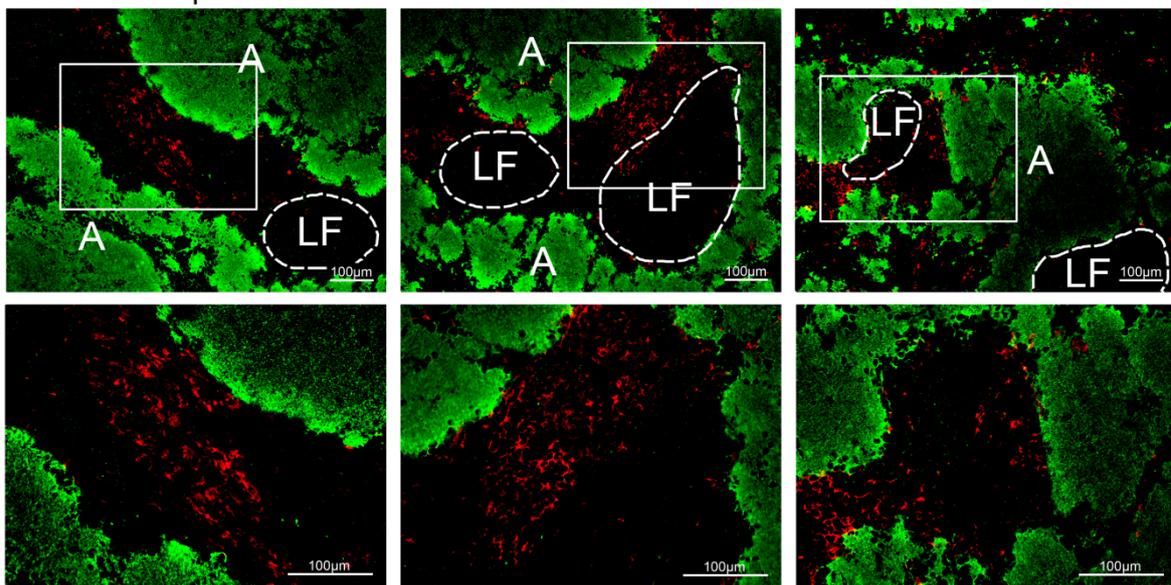


FISH

Abb. 18: **Die Abszessbildung in C57BL/6-Mäusen einen, zwei und drei Tage nach Infektion mit *Y. enterocolitica*.** C57BL/6-Mäuse wurden mit 5×10^4 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels FISH wurden Yersinien rot gefärbt. Die CFU betrug $\log 5,58 \pm 0,21$ einen Tag, $\log 7,17 \pm 0,24$ zwei Tage und $\log 8,00 \pm 0,23$ drei Tage nach der Infektion. Beschriftung: LF = Lymphfollikel, A = Abszess. In der oberen Reihe sind Bildausschnitte in 10 x Vergrößerung zu sehen, der Kasten markiert den Bildausschnitt der unteren Reihe in 20 x Vergrößerung.

Am dritten Tag nach der Infektion befinden sich in der Milz von $MyD88^{-/-}$ -Mäusen sehr ausgedehnte konfluierende Abszesse, welche ein Vielfaches mehr Fläche einnehmen als bei C57BL/6- und 129Sv-Mäusen (siehe Abb. 19 und 22). Einzelne Reste von Follikeln sind zu erkennen und die $CD11c^{+}$ -Zellzahl ist sehr gering. $MyD88^{-/-}$ -Mäuse weisen die größte Abszessfläche und –umfang von allen Mausstämmen auf (siehe Abb. 24 und 25). Die CFU ist, sogar bei niedriger Infektionsdosis (5×10^2), mit $\log 9,38$ deutlich höher als bei C57BL/6- und 129Sv-Mäusen. Die Milz ist mit 0,28 g ebenfalls stark vergrößert.

Ye 5×10^2 3 dpi



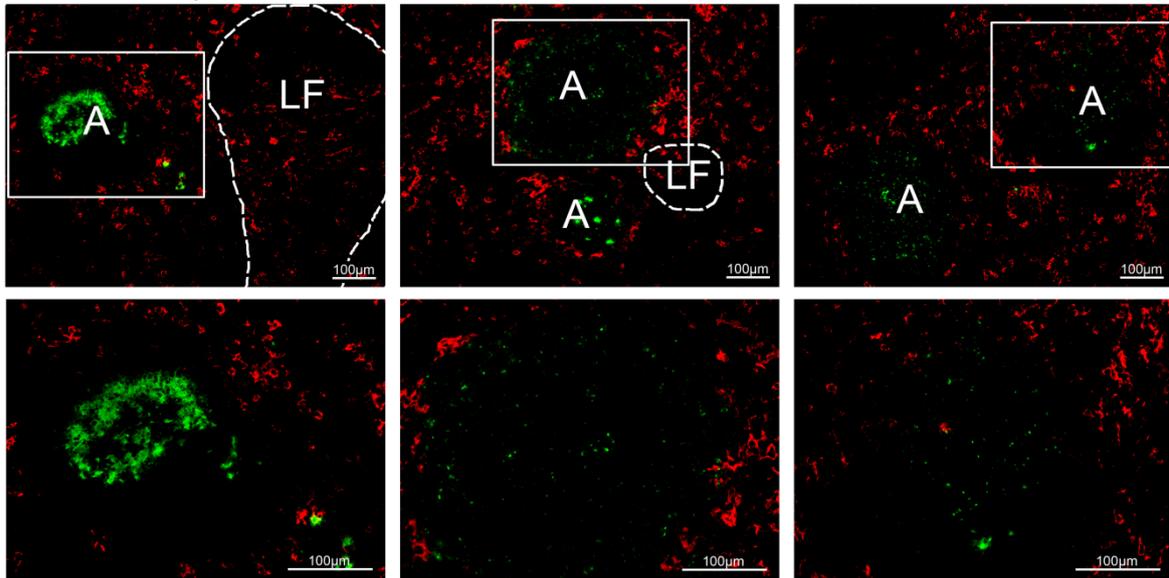
CD11c Wa-vital

Abb. 19: Die Abszessbildung in $MyD88^{-/-}$ -Mäusen drei Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. $MyD88^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 5×10^2 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden $CD11c^{+}$ -Zellen rot, Yersinien grün gefärbt. Die CFU betrug 9.38 ± 0.12 . Beschriftung: LF = Lymphfollikel, A = Abszess. In der oberen Reihe sind Bildausschnitte in 10 x Vergrößerung zu sehen, der Kasten markiert den Bildausschnitt der unteren Reihe in 20 x Vergrößerung.

Die Milz $TRIF^{-/-}$ defizienter Mäuse weisen von allen Mausstämmen die geringste Abszessfläche und –umfang auf (siehe Abb. 24 und 25). Die Abszesse sind klein und nicht sehr intensiv gefärbt (siehe Abb. 9). Die Anzahl der Abszesse liegt etwas über dem Wert von $TLR2^{-/-}$ x $TLR4^{-/-}$ -Mäusen, welche im Gegenzug jedoch großflächigere Abszesse und somit eine höhere Abszessfläche pro Milzschnitt aufweisen. Follikel sind zahlreich erhalten und die $CD11c^{+}$ -Zellen sind mäßig dezimiert. Die CFU liegt bei \log

6,84 und das Milzgewicht bei 0,18 g. Diese Werte liegen nur wenig über den Werten von TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäusen und deutlich unter den Werten von C57BL/6-, 129Sv- und MyD88^{-/-}-Mäusen.

Ye 5 x 10³ 3 dpi



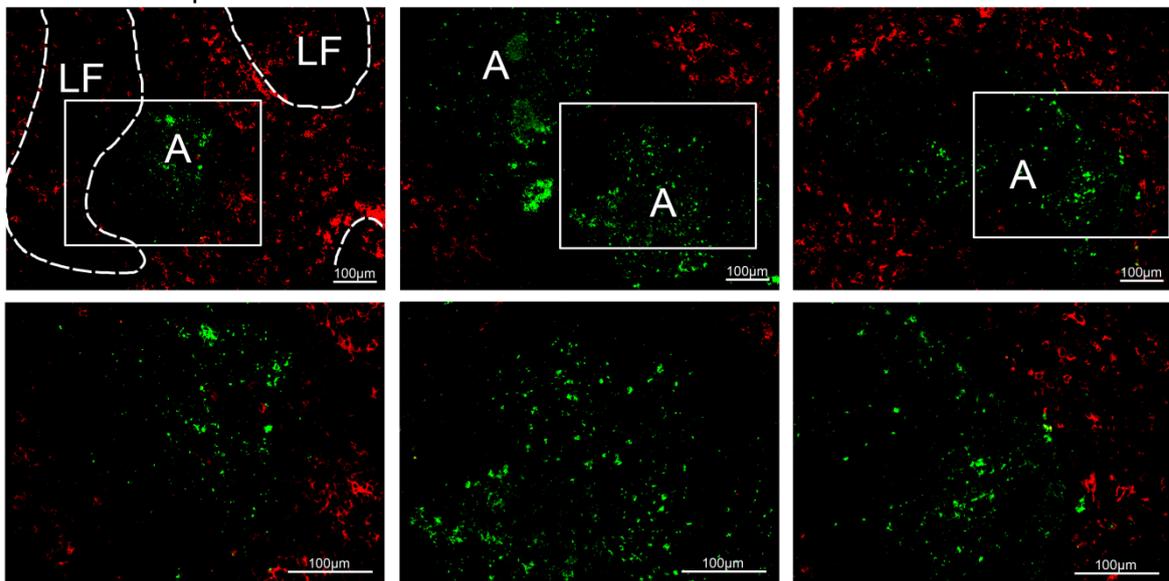
CD11c Wa-vital

Abb. 20: **Die Abszessbildung in TRIF^{-/-}-Mäusen drei Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*.** TRIF^{-/-}-Mäuse wurden mit 5 x 10³ *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün gefärbt. Die CFU betrug 6,84 ± 0,68. Beschriftung: LF = Lymphfollikel, A = Abszess. In der oberen Reihe sind Bildausschnitte in 10 x Vergrößerung zu sehen, der Kasten markiert den Bildausschnitt der unteren Reihe in 20 x Vergrößerung.

Bei TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäusen findet sich in der Milz ein ähnliches Bild wie bei TRIF^{-/-}-Mäusen. Die Abszesse sind großflächiger, jedoch nicht sehr intensiv gefärbt. TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäuse haben die geringste Anzahl an Abszessen pro Milzschnitt, allerdings ist die Fläche und der Umfang der Abszesse größer als bei TRIF^{-/-}-Mäusen. Follikel sind dort, wo sich keine Abszesse befinden, erhalten und die Zahl an CD11c⁺-Zellen ist nur mäßig verringert (siehe Abb. 21). Im Vergleich zu C57BL/6- und 129Sv-Mäusen ist bei TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäusen die Zahl der Abszesse sowie die Abszessfläche pro Milz deutlich geringer und das Milzgewicht ist mit 0,14 g nur mäßig erhöht. Die mittlere Abszessfläche liegt zwischen den Werten von C57BL/6- und 129Sv-Mäusen und für den Abszessumfang weisen TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}- und 129Sv-Mäuse fast identische

Werte auf (siehe Tab. 7). Die CFU liegt mit log 6,43 (bei gleicher Infektionsdosis) unter der von C57BL/6- und 129Sv-Mäusen.

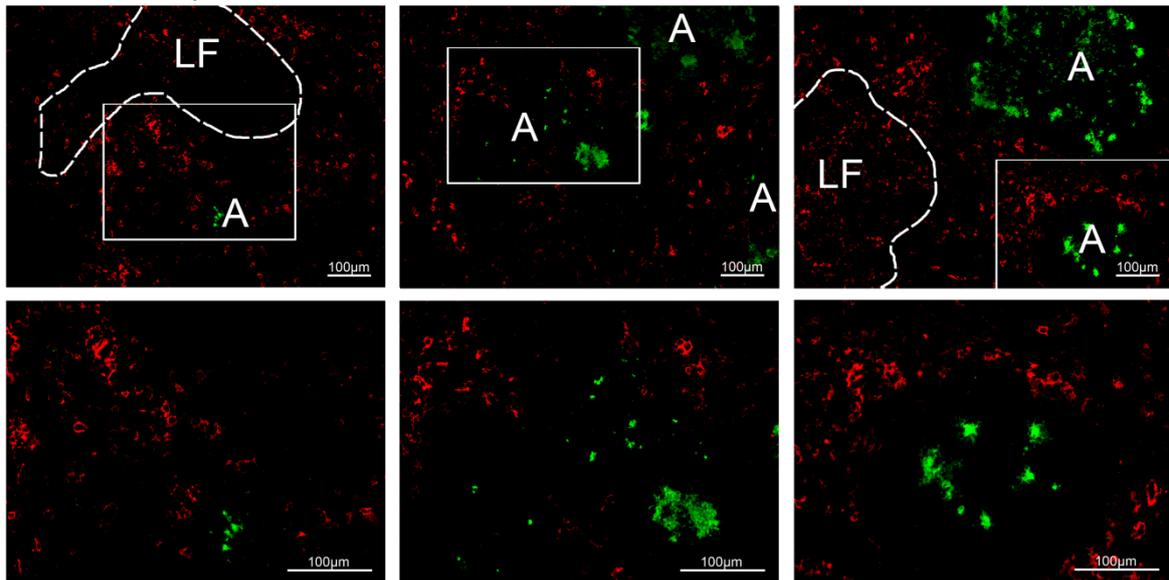
Ye 5×10^4 3 dpi



CD11c Wa-vital

Abb. 21: Die Abszessbildung in $TLR2^{-/-} \times TLR4^{-/-}$ -Mäusen drei Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. $TLR2^{-/-} \times TLR4^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 5×10^4 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden $CD11c^{+}$ -Zellen rot, Yersinien grün gefärbt. Die CFU betrug $6,43 \pm 0,35$. Beschriftung: LF = Lymphfollikel, A = Abszess. In der oberen Reihe sind Bildausschnitte in 10 x Vergrößerung zu sehen, der Kasten markiert den Bildausschnitt der unteren Reihe in 20 x Vergrößerung.

Am dritten Tag nach der Infektion findet sich in der Milz von 129Sv-Mäusen ein ähnliches Bild wie bei C57BL/6-Mäusen. Die Abszesse sind etwas größer, jedoch nicht so zahlreich und weniger stark gefärbt (siehe Abb. 22). Die Abszessgröße ist ähnlich der von $TLR2^{-/-} \times TLR4^{-/-}$ -Mäusen, wenngleich 129Sv-Mäuse deutlich mehr Abszessbildung aufweisen. Nach $MyD88^{-/-}$ -Mäusen haben 129Sv-Mäuse die höchsten Werte in Fläche und Umfang der Abszesse (siehe Tab. 7). Follikel sind vereinzelt erhalten und die Zahl der $CD11c^{+}$ -Zellen ist deutlich reduziert. Die CFU liegt bei log 7,82 und das Milzgewicht bei 0,25 g. Damit liegt die CFU nur wenig über den Werten von C57BL/6-Mäusen und das Milzgewicht ist gleich.

Ye 5 x 10⁴ 3 dpi

CD11c Wa-vital

Abb. 22: Die Abszessbildung in 129Sv-Mäusen drei Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. 129Sv-Mäuse wurden mit 5×10^4 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün gefärbt. Die CFU betrug 7.82 ± 0.23 . Beschriftung: LF = Lymphfollikel, A = Abszess. In der oberen Reihe sind Bildausschnitte in 10 x Vergrößerung zu sehen, der Kasten markiert den Bildausschnitt der unteren Reihe in 20 x Vergrößerung.

Tab. 6: Die Infektionsdosis, Bakterienlast (CFU = colony forming units) und das Milzgewicht der untersuchten Mausstämmen am dritten Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*.

Maus	C57BL/6	MyD88	TRIF	TLR2xTLR4	129Sv
Dosis	5×10^4	5×10^2	5×10^3	5×10^4	5×10^4
CFU log	$7,72 \pm 0,42$	$9,38 \pm 0,12$	$6,84 \pm 0,68$	$6,43 \pm 0,35$	$7,82 \pm 0,23$
Milzgewicht in g	$0,25 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,02$

Die Mäuse wurden mit *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert, drei Tage nach der Infektion wurde die Milz entnommen, gewogen und die CFU auf kulturellem Weg bestimmt.

Zum Vergleich der Abszessbildung zeigt Abbildung 23 eine Übersicht der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen. Um die oben beschriebenen Eindrücke zu verdeutlichen und zu verifizieren, wurden HE-Färbungen der Cryoschnitte angefertigt (siehe Abb. 24). Hier zeigt sich ein sehr ähnliches Bild wie bei der Fluoreszenzfärbung. Mittels des Programms Cell[^]B wurde anschließend eine Messung des Umfangs und der Anzahl der Abszesse pro Milzschnitt durchgeführt. Es wurden fünf Mäuse pro Mausstamm untersucht.

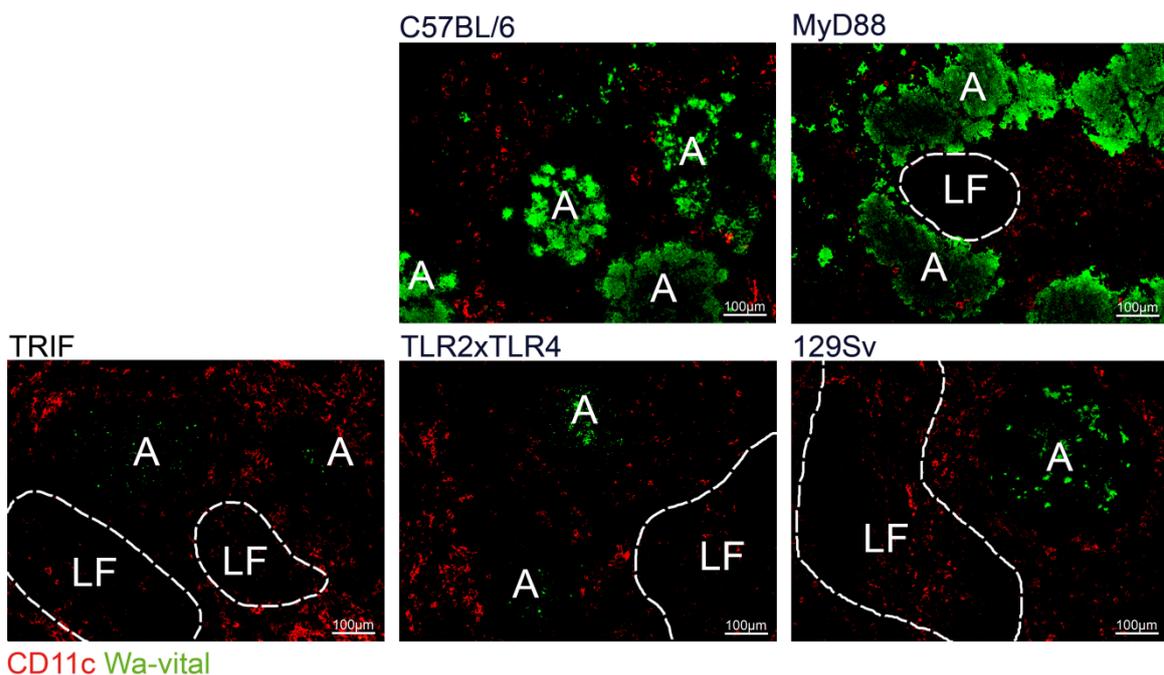


Abb. 23: Vergleich der Abszessbildung in den unterschiedlichen Mausstämmen drei Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Die Mäuse wurden mit *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün gefärbt. Die CFU betrug $\log 7,72 \pm 0,42$ bei C57BL/6-Mäusen, $\log 9,38 \pm 0,12$ bei MyD88^{-/-}-Mäusen, $\log 6,84 \pm 0,68$ bei TRIF^{-/-}-Mäusen, $\log 6,43 \pm 0,35$ bei TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäusen, $\log 7,82 \pm 0,23$ bei 129Sv-Mäusen. Beschriftung: LF = Lymphfollikel, A = Abszess.

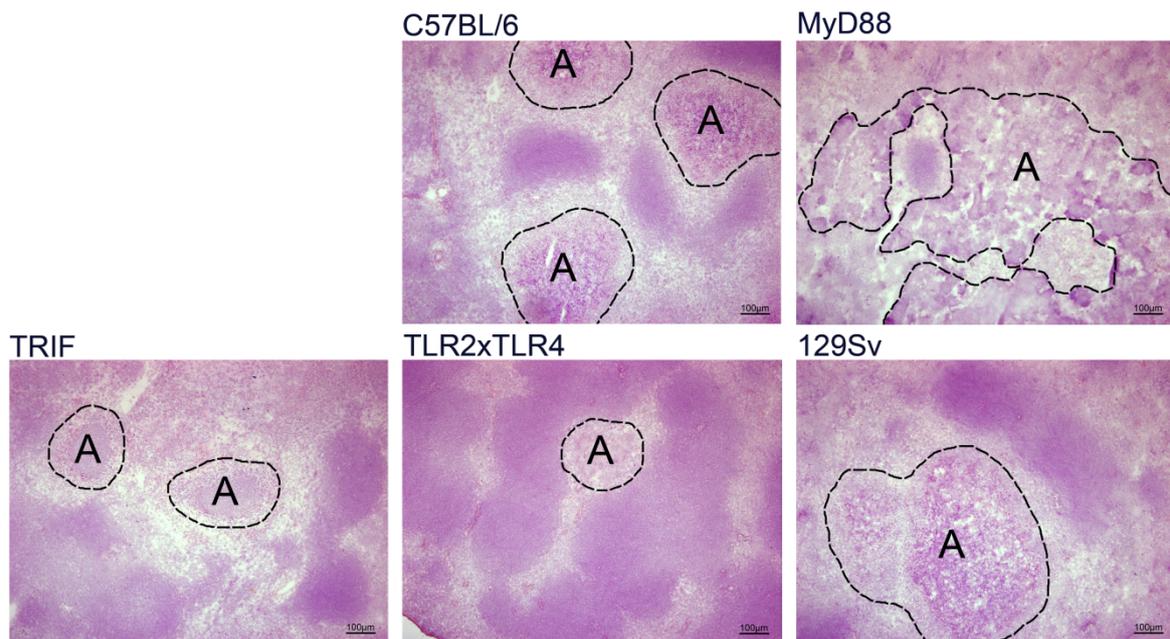


Abb. 24: Vergleich der Abszessbildung in den unterschiedlichen Mausstämmen drei Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Die Mäuse wurden mit *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels HE-Färbung wurden basophile Strukturen (Zellkerne) blau und acidophile Strukturen (Zellplasma) rot gefärbt. Die CFU betrug $\log 7,72 \pm 0,42$ bei C57BL/6-Mäusen, $\log 9,38 \pm 0,12$ bei MyD88^{-/-}-Mäusen, $\log 6,84 \pm 0,68$ bei TRIF^{-/-}-Mäusen, $\log 6,43 \pm 0,35$ bei TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäusen, $\log 7,82 \pm 0,23$ bei 129Sv-Mäusen. Beschriftung: A = Abszess, Balken entspricht 100 µm.

In der Auswertung von Fläche und Umfang der Abszesse stechen die MyD88^{-/-}-Mäuse deutlich heraus. Sowohl in Fläche als auch Umfang haben sie mit großem Abstand die höchsten Messwerte. C57BL/6- und 129Sv-Mäuse weisen sehr ähnliche Werte in Fläche und Umfang der Abszesse auf. TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäuse liegen bei Abszessfläche und -umfang zwischen C57BL/6- und 129Sv-Mäusen. Da sie jedoch eine sehr geringe Abszessanzahl pro Milzschnitt aufweisen, ist die Abszessfläche pro Milz sehr gering. TRIF^{-/-}-Mäuse haben die geringsten Werte in Umfang und Fläche. Tab. 7 zeigt die Mittelwerte der Abszess-Auszählung und Abb. 25 und 26 ihre graphische Darstellung.

Tab. 7: Abszessfläche und -umfang der untersuchten Mausstämme am dritten Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*.

Mittelwert	BL6	MyD88	TRIF	TLR2x4	129Sv
Abszessfläche / Milz	5.210.852	11.399.660	321.107	692.452	5.309.703
Abszessfläche	163.707	519.147	38.777	205.512	240.413
Abszessumfang	1.656	3.455	785	2.011	2.004
Abszesszahl / Milz	33	22	8	4	22

Die Mäuse wurden mit *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und drei Tage nach der Infektion wurden Cryoschnitte der Milz angefertigt und HE gefärbt. Es wurden jeweils fünf Mäuse pro Maus-Stamm für die Auszählung verwendet. Die gesamte Milz wurde in 5x Vergrößerung abgebildet und die Abszesse mit dem Programm Cell^B markiert und gemessen. Die erste Zeile zeigt den Mittelwert der Abszessfläche pro Milz; die zweite Zeile zeigt die insgesamt pro Mausstamm gemessene Abszessfläche; die dritte Zeile zeigt den Mittelwert des Abszessumfangs aus allen gemessenen Milzen des Mausstammes; die vierte Zeile zeigt den Mittelwert aus der Abszesszahl pro Milz.

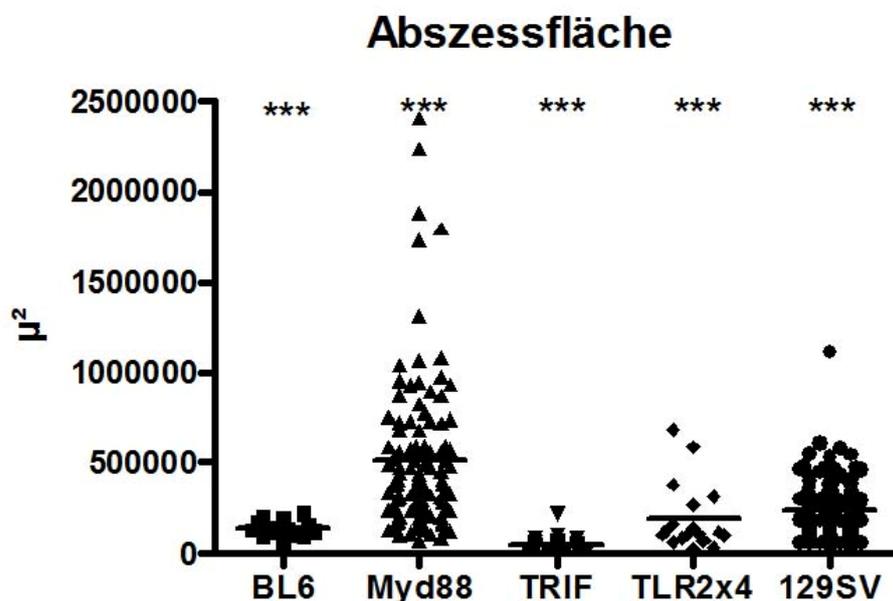


Abb. 25: Abszessfläche der untersuchten Mausstämme am dritten Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Die Mäuse wurden mit *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und drei Tage nach Infektion Cryoschnitte der Milz angefertigt und HE gefärbt. Es wurden jeweils fünf Mäuse pro Maus-Stamm für die Auszählung verwendet. Die gesamte Milz wurde in 5x Vergrößerung abgebildet und die Abszesse mit dem Programm Cell^B markiert und gemessen. Die statistische und graphische Auswertung erfolgte mit Graph Pad Prism.

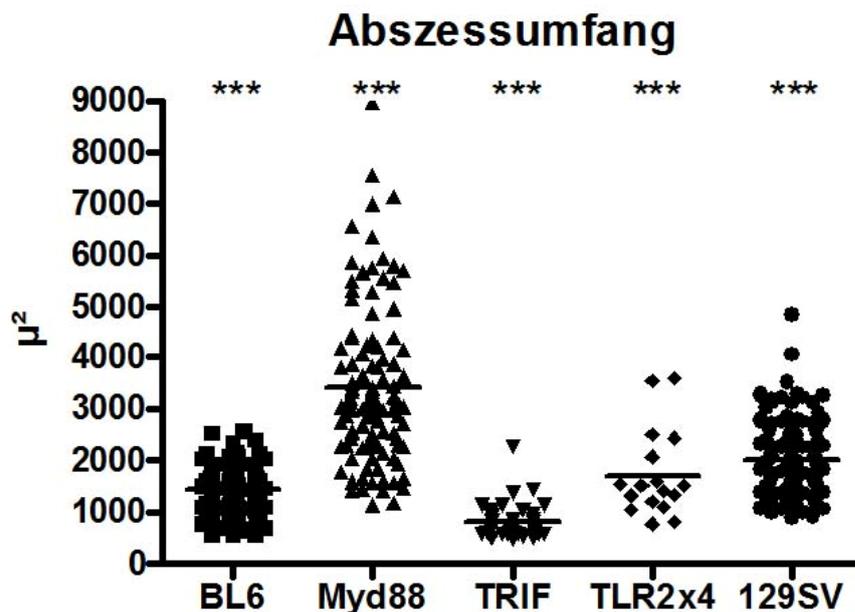


Abb. 26: **Abszessumfang** der untersuchten Mausstämmen am dritten Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Die Mäuse wurden mit *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und drei Tage nach Infektion Cryoschnitte der Milz angefertigt und HE gefärbt. Es wurden jeweils fünf Mäuse pro Mausstamm für die Auszählung verwendet. Die gesamte Milz wurde in 5 x Vergrößerung abgebildet und die Abszesse mit dem Programm Cell[^]B markiert und gemessen. Die statistische und graphische Auswertung erfolgte mit Graph Pad Prism.

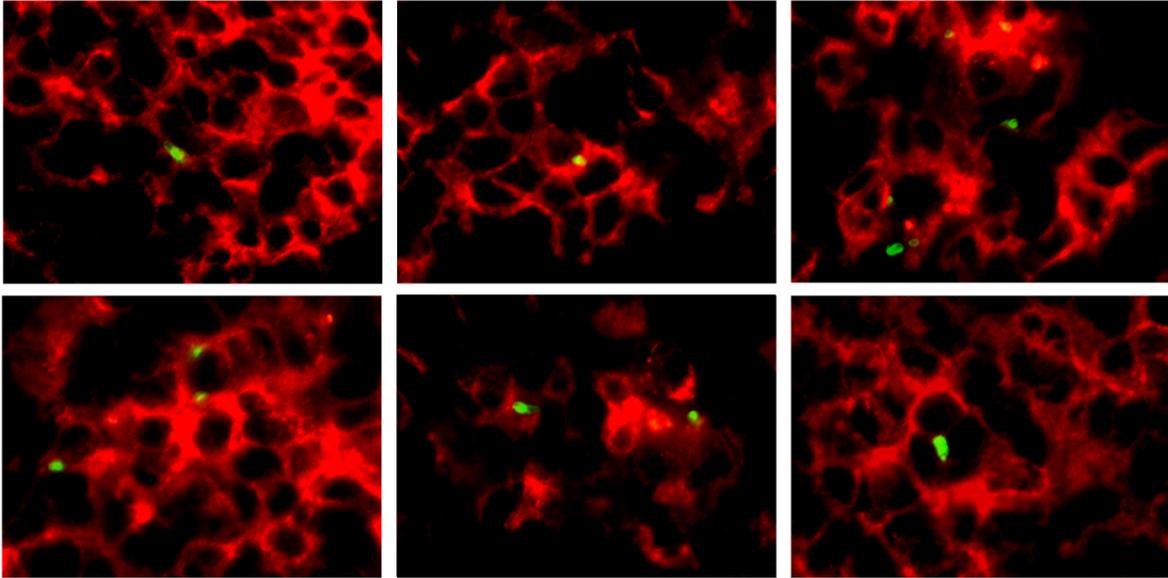
Es konnten die Ergebnisse der FACS-Untersuchung in diesen Versuchen untermauert werden. Analog zur niedrigen DC-Zahl findet sich eine starke Abszessbildung in der Milz von MyD88^{-/-}, C57BL/6- und 129Sv-Mäusen. Die stärkste Abszessbildung mit großflächigen, teils konfluierenden Abszessen ist in MyD88^{-/-} Mäusen zu sehen. Es folgen 129Sv- und C57BL/6-Mäuse, welche einen sehr ähnlichen Wert in der eingenommenen Abszessfläche pro Milz aufweisen. Die Abszesse in der Milz von 129Sv-Mäusen sind großflächig, jedoch nicht so zahlreich wie bei C57BL/6-Mäusen. TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäuse haben weniger Abszesse in der Milz als 129Sv-Mäuse, bei fast gleicher Fläche und Umfang der einzelnen Abszesse. Bei TRIF^{-/-}-Mäusen nehmen die Abszesse die geringste Fläche der Milz ein. Die Abszesse haben einen sehr geringen Umfang, sind jedoch zahlreicher als bei TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäusen. Die Anzahl von CD11c⁺-DCs verhält sich also entgegengesetzt zur Größe der Abszessfläche. Es wurde keine typische Lokalisation für Abszesse in der Milz gefunden. In allen Mausstämmen finden sich Abszesse sowohl in der MZ und PFZ als auch in der im LF selbst.

3.4 Interaktion Yersinien und DCs

Obwohl *Y. enterocolitica* überwiegend extrazelluläre Bakterien sind, können sie maßgeblich Einfluss auf zelluläre Funktionen von Immunzellen nehmen. Mittels eines Adhäsins können sie an eukaryotische Zellen binden und durch einen Injektionsapparat Effektorproteine in die Zelle einbringen. Diese Proteine, Yops genannt, bewirken die Hemmung der Immunantwort und es kann die Apoptose in DCs eingeleitet werden.¹⁸³ Aidkins *et al.* konnten bereits *in vitro* eine Interaktion von *Y. enterocolitica* und DCs fluoreszenzmikroskopisch darstellen.

Ziel dieser Untersuchung war, den Kontakt zwischen *Y. enterocolitica* und CD11c⁺-DCs *in vivo* darzustellen. Bei vorherigen Versuchen zeigten sich Hinweise auf eine mögliche Interaktion, besonders zu frühen Zeitpunkten der Infektion (siehe 3.2). Es wurden C57BL/6-Mäuse mit *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und zu den Zeitpunkten 30 Minuten, drei, sechs, und 12 Stunden (Dosis 1×10^7) sowie einen und drei Tage nach Infektion (Dosis 5×10^4), Cryoschnitte der Milz angefertigt. Auch bei den Mausstämmen MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-}, TLR2x4^{-/-} und 129Sv wurde die Frage der Interaktion am dritten Tag nach der Infektion untersucht (Dosis siehe Tab. 6). Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden CD11c⁺-DCs und Yersinien mit spezifischen Antikörpern markiert und mittels Fluoreszenz Sekundärantikörpern gefärbt. Um die Struktur der Milz beurteilen zu können, wurde eine Kernfärbung (DAPI) angewendet. Zu den Zeitpunkten 30 Minuten und drei Stunden nach der Infektion befinden sich Yersinien zusammen mit CD11c⁺-DCs in der MZ der LF. Die Yersinien können in starker Vergrößerung einzeln dargestellt werden und es ist eine räumliche Beziehung zwischen CD11c⁺-DCs und *Y. enterocolitica* zu sehen. Abbildung 31 (erste Reihe) zeigt die Vorgehensweise, um vergrößerte Aufnahmen eines Gebietes zu erstellen. Einzelne Bakterien lassen sich nicht nur durch die Färbung, sondern auch durch Größe (0,5-0,8 x 1-3 µm) und Stäbchen-Form erkennen (siehe Abb. 27 und 28).

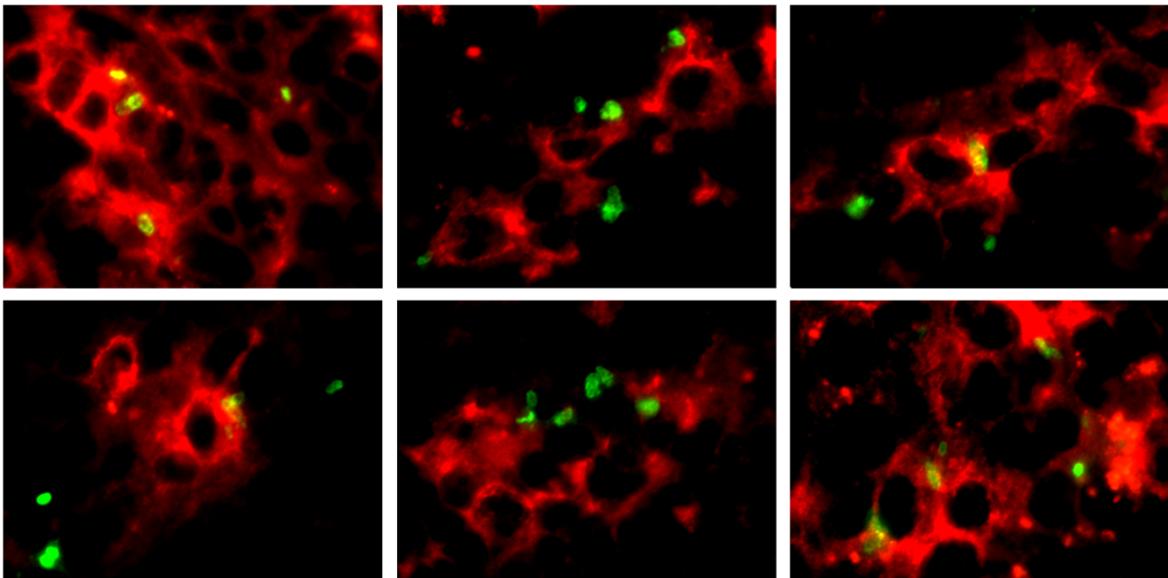
Ye 1×10^7 30 min



CD11c Wa-vital

Abb. 27: **Die Interaktion in C57BL/6-Mäusen 30 Minuten nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*.** C57BL/6-Mäuse wurden mit 1×10^7 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün gefärbt. Bilder in zweifach Zoom aus 63 x Vergrößerung.

Ye 1×10^7 3 h

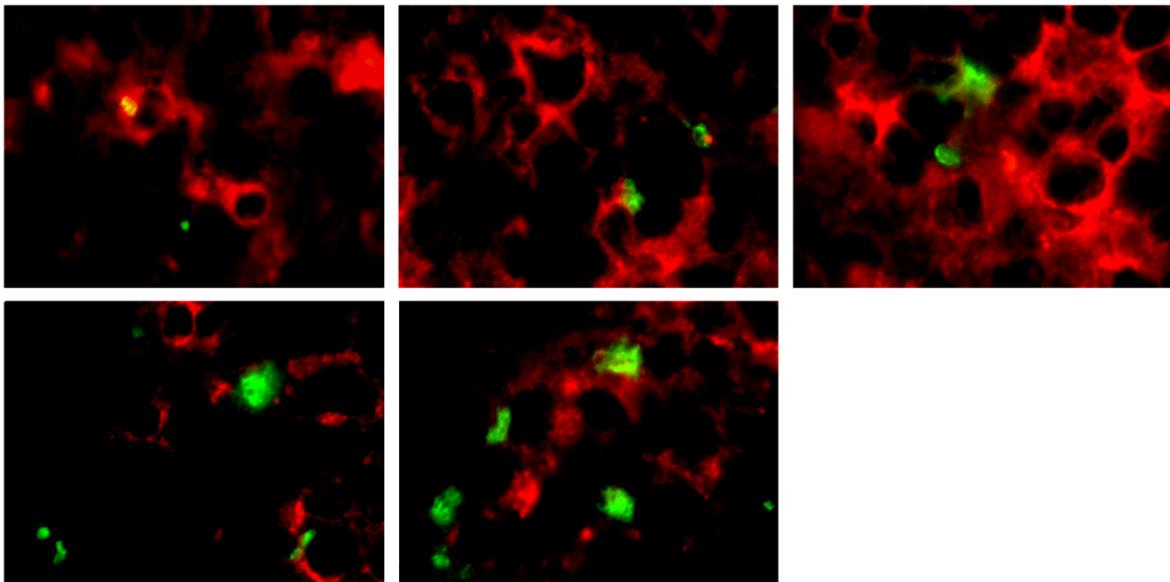


CD11c Wa-vital

Abb. 28: **Die Interaktion in C57BL/6-Mäusen drei Stunden nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*.** C57BL/6-Mäuse wurden mit 1×10^7 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün gefärbt. Bilder in zweifach Zoom aus 63 x Vergrößerung.

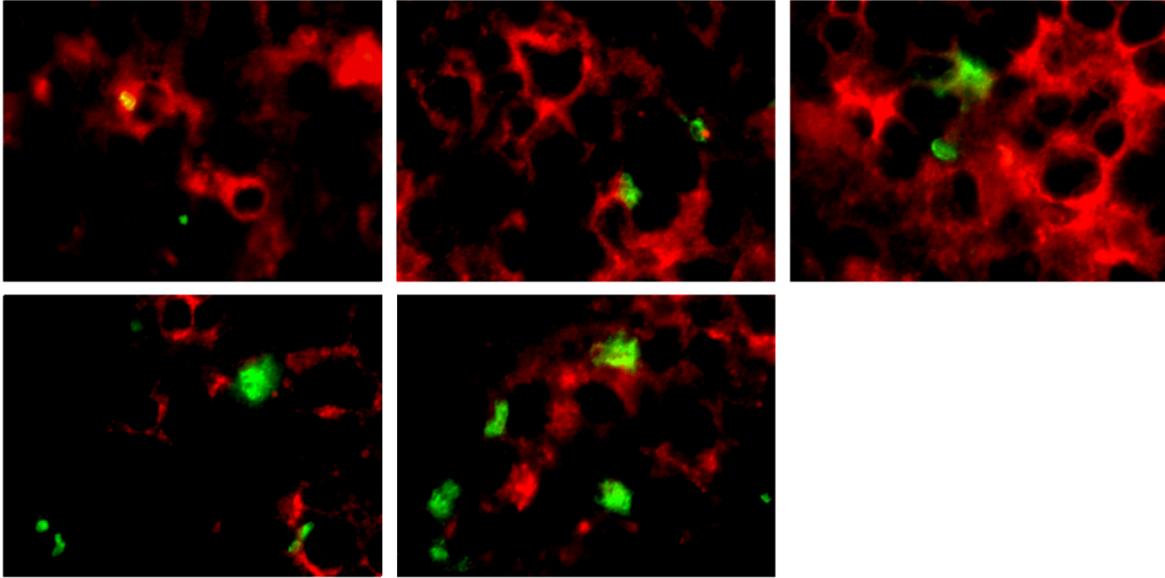
Zu den Zeitpunkten sechs und 12 Stunden nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* lassen sich in der Vergrößerung weniger einzelne Bakterien in der Milz erkennen (siehe Abb. 28 und 29). Es sind Kolonien von Bakterien zu sehen, welche sehr viele Antikörper binden und ein starkes Signal abgeben. Diese Kolonien befinden sich in größerer räumlicher Distanz zu CD11c⁺-DCs, da sich DCs zu diesem Zeitpunkt der Infektion überwiegend in der T-Zell-Region und nur in geringer Anzahl in der MZ befinden. Wenn auch nicht mehr so zahlreich wie 30 Minuten und drei Stunden nach der Infektion, sind Kontakte zwischen CD11c⁺-DCs und Yersinien nachweisbar.

Ye 1 x 10⁷ 6 h



CD11c Wa-vital

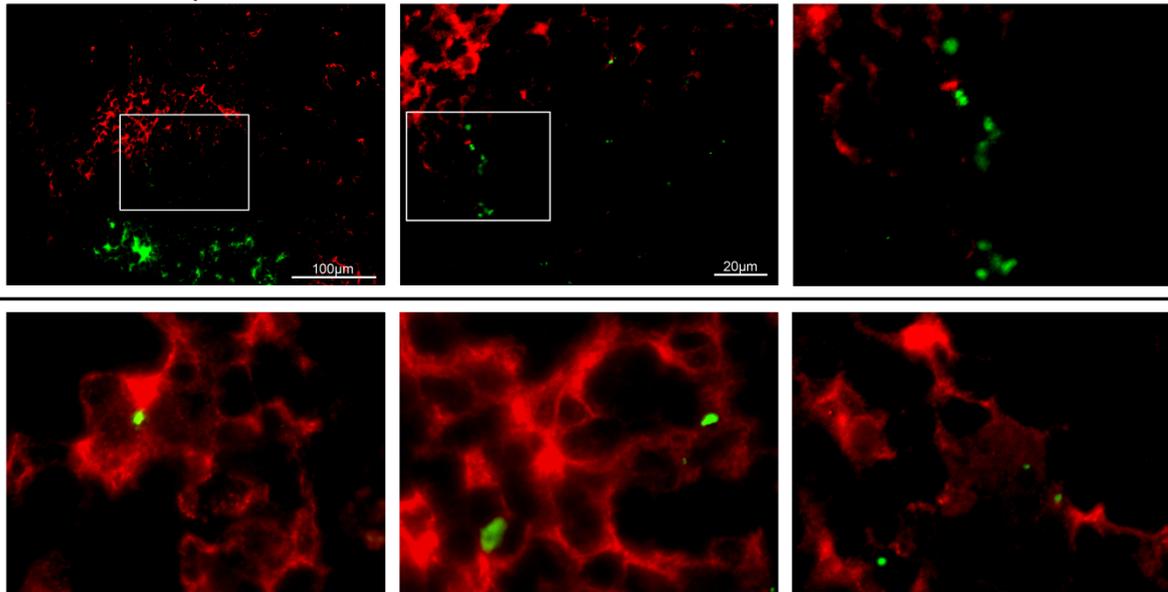
Abb. 29: **Die Interaktion in C57BL/6-Mäusen sechs Stunden nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*.** C57BL/6-Mäuse wurden mit 1 x 10⁷ *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün gefärbt. Bilder in zweifach Zoom aus 63 x Vergrößerung.

Ye 1 x 10⁷ 6 h

CD11c Wa-vital

Abb. 30: **Die Interaktion in C57BL/6-Mäusen 12 Stunden nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*.** C57BL/6-Mäuse wurden mit 1 x 10⁷ *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün gefärbt. Bilder in zweifach Zoom aus 63 x Vergrößerung.

Einen Tag nach der Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *Y. enterocolitica* lassen sich, ähnlich wie 12 Stunden nach der Infektion, wenige einzelne Bakterien erkennen. Es sind Kolonien von Bakterien und Abszesse zu sehen. Wieder ist eine größere räumliche Distanz von CD11c⁺-Zellen und Yersinien gegeben, da sich die DCs zu diesem Zeitpunkt der Infektion überwiegend in der T-Zell-Region befinden. Dennoch lassen sich einzelne Bakterien in unmittelbarer Nähe zu CD11c⁺-DCs erkennen (siehe Abb. 31). Besonders am Rande von Abszessen befinden sich DCs in Kontakt mit Yersinien.

Ye 5×10^4 1 dpi

CD11c Wa-vital

Abb. 31: Die Interaktion in C57BL/6-Mäusen einen Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. C57BL/6-Mäuse wurden mit 5×10^4 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün gefärbt. Die obere Reihe zeigt exemplarisch die Entstehung eines stark vergrößerten Bildausschnittes. Die Kästen markieren die Bildausschnitte von links nach rechts: 20 x, 63 x Vergrößerung und zweifach Zoom aus der 63x Vergrößerung. Die untere Reihe zeigt Bilder in zweifach Zoom aus der 63 x Vergrößerung.

Die Interaktion zwischen DCs und Yersinien wurde in den Knockout-Mäusen und 129Sv-Mäusen lediglich am dritten Tage der Infektion mit *Y. enterocolitica* untersucht. Es konnte leider keine Untersuchung zu früheren Infektionszeitpunkten bei diesen Mäusen vorgenommen werden, da die Anzahl der Zuchttiere dies nicht zuließ. Am dritten Tag nach der Infektion ist die Abszessbildung in der Milz bei allen Mausstämmen weit fortgeschritten. Es lassen sich nur wenige einzelne Bakterien am Rande von Abszessen erkennen. In TLR2x4^{-/-}, TRIF^{-/-} und 129Sv-Mäusen ist vereinzelt ein Zusammentreffen von Yersinien und CD11c⁺-Zellen zu sehen (siehe Abb. 32). In der Milz von MyD88^{-/-}-Mäusen ist keine Interaktion zu beobachten. Dies mag an der besonders starken Abszessbildung in diesen Mäusen liegen.

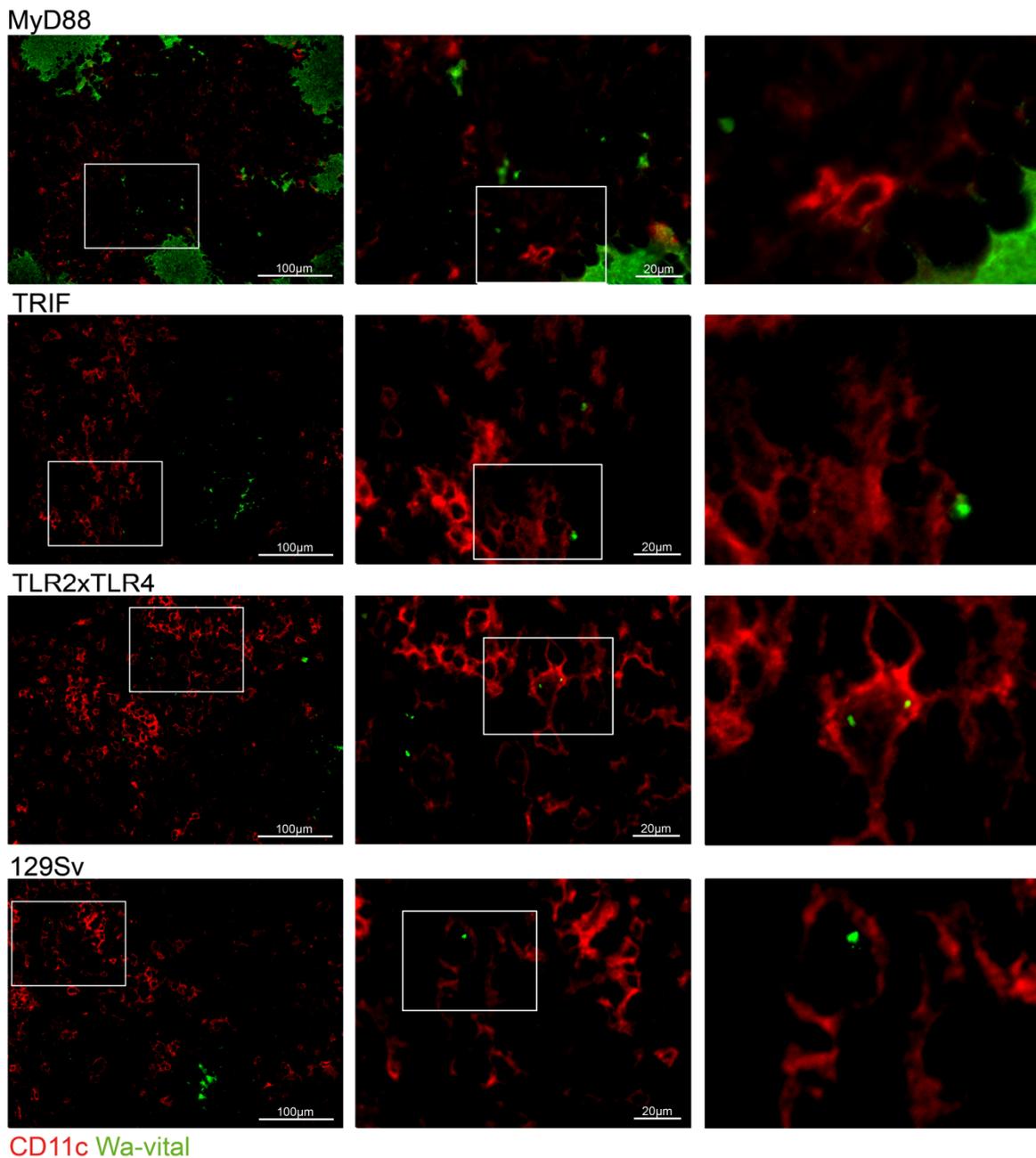


Abb. 32: Die Interaktion in MyD88^{-/-}, TLR2x4^{-/-}, TRIF^{-/-} und 129Sv-Mäusen drei Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Die Mäuse wurden mit *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot, Yersinien grün gefärbt. Für die CFU siehe Tab. 6. Die Mausstämme sind in der Reihenfolge MyD88^{-/-}, TLR2x4^{-/-}, TRIF^{-/-} und 129Sv von oben nach unten zu sehen. Die Kästen markieren die Bildausschnitte. Die linke Spalte zeigt ein Bild in 20 x Vergrößerung; die mittlere Spalte eine 63 x Vergrößerung des Bildausschnitts von links und die rechte Spalte einen zweifach Zoom des Bildausschnitts aus der Mitte.

Vorausgegangene Bilder konnten zahlreiche Interaktionen zwischen Yersinien und DCs zeigen, jedoch nicht eindeutig die Frage nach intrazellulären Bakterien klären. Um den Kontakt zwischen *Y. enterocolitica* und DCs aus einem anderen Blickwinkel zu untersuchen, wurden Cryoschnitte der frühen Infektionszeitpunkte (30 Minuten, drei, sechs und 12 Stunden) von C57BL/6-Mäusen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Zunächst wurden die Beobachtungen aus 3.2 bestätigt. Die Yersinien befinden sich rund um die LF angeordnet, in steigender Anzahl mit fortschreitender Infektion. Zu frühen Zeitpunkten der Infektion sind viele einzelne Bakterien vorhanden, später sind diese zunehmend in Kolonien angeordnet (siehe Abb. 33).

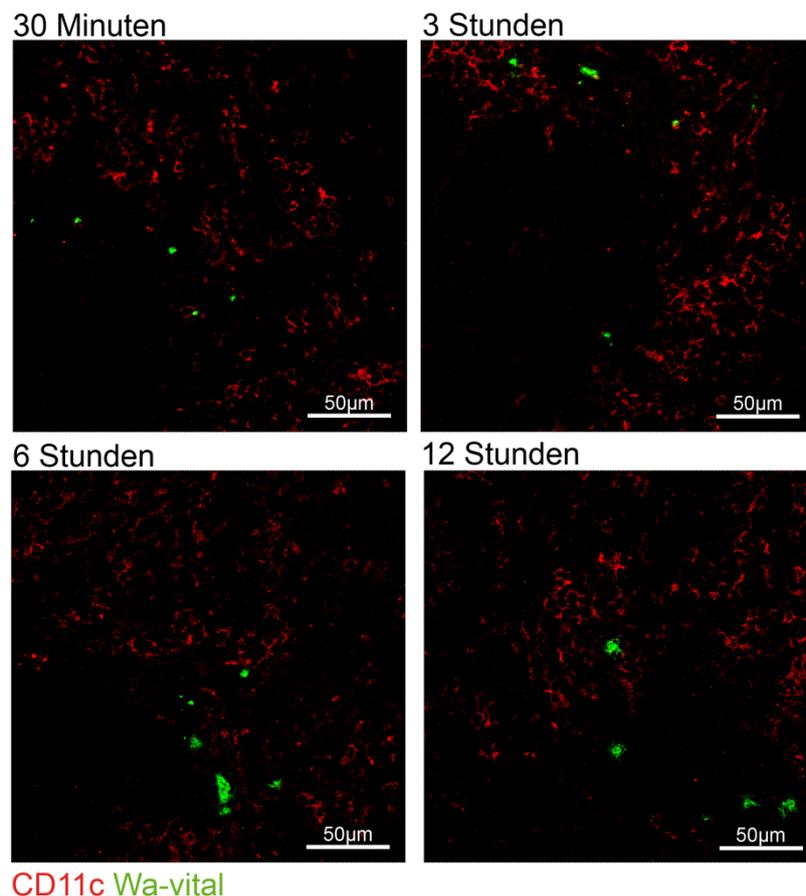


Abb. 33: Die Interaktion in C57BL/6-Mäusen 30 Minuten und drei, sechs und 12 Stunden nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. C57BL/6-Mäuse wurden mit 1×10^7 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot und Yersinien grün gefärbt. Die Abbildungen zu den Infektionszeitpunkten wie folgt angeordnet: Oben links 30 Minuten; oben rechts 3 Stunden; unten links 6 Stunden; unten rechts 12 Stunden.

Anschließend wurde die Funktion der Leica Confocal Software genutzt, mehrere Bildebenen übereinanderzulegen und ein zweidimensionales Bild der Milzschnitte zu erzeugen. Dadurch sollte weiter eingegrenzt werden, ob Yersinien intrazellulär in DCs zu finden sind. Da einzelne Yersinien 30 Minuten und drei Stunden nach der Infektion am häufigsten zu finden waren, wurden diese Zeitpunkte für die Anwendung ausgewählt. Hier lassen sich Yersinien in unmittelbarem Kontakt zu DCs erkennen (siehe Abb. 34). Dies ist sowohl in der Aufsicht als auch in der horizontalen und vertikalen Schnittebene zu erkennen. Allerdings lässt sich auch mit dieser Methode nicht eindeutig sagen, ob sich die Yersinien innerhalb der DCs befinden.

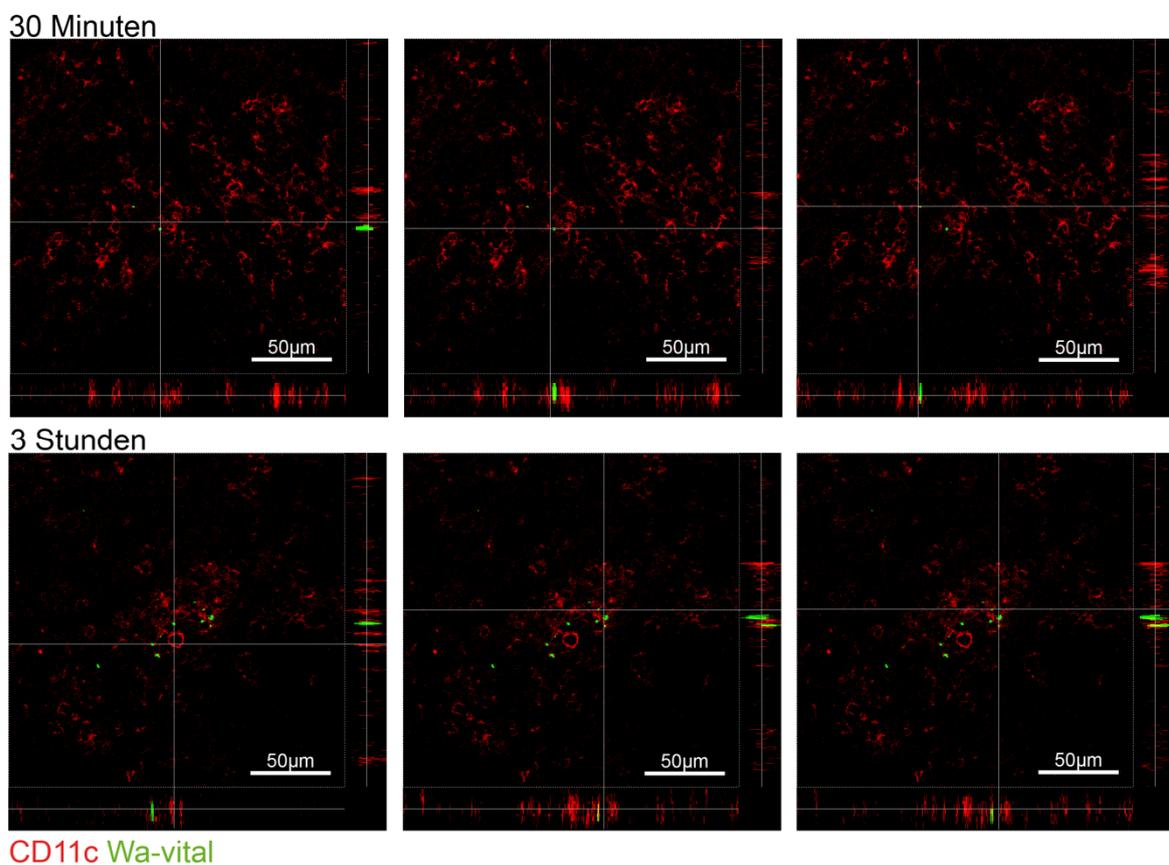


Abb. 34: **Die Interaktion in C57BL/6-Mäusen 30 Minuten und drei Stunden nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*.** C57BL/6-Mäuse wurden mit 1×10^7 *Y. enterocolitica* pYV⁺ infiziert und Cryoschnitte der Milz angefertigt. Mittels Fluoreszenzfärbung wurden CD11c⁺-Zellen rot und Yersinien grün gefärbt. In der oberen Reihe sind die Bilder 30 Minuten und in der unteren Reihe drei Stunden nach Infektion zu sehen. Die vertikale Linie entspricht der Schnittebene des rechten Bildrandes und die horizontale Linie entspricht der Schnittebene des unteren Bildrandes.

Es konnte eine Interaktion bzw. ein direkter Kontakt zwischen CD11c⁺-DCs und *Y. enterocolitica* *in vivo* gezeigt werden. Am eindrucksvollsten und häufigsten ist dies 30 Minuten und drei Stunden nach der Infektion sichtbar. Zu diesen Zeitpunkten sind in vergrößerten Aufnahmen viele einzelne Yersinien in unmittelbarer Nähe DCs zu erkennen (siehe Abb. 27, 28, 33 und 34). Zu späteren Zeitpunkten der Infektion sind Yersinien überwiegend in Kolonien bzw. Abszessen zu finden und es befinden sich immer weniger einzelne Bakterien in Kontakt mit DCs. Ein eindeutiger Nachweis intrazellulärer Yersinien konnte hier leider nicht erbracht werden. Es konnte der unmittelbare Kontakt zwischen *Y. enterocolitica* und DCs in starker Vergrößerung und verschiedenen Schnittebenen gezeigt werden. Eine klare Zuordnung der Yersinien als intrazellulär war jedoch nicht möglich.

4 Diskussion

Die Interaktion zwischen *Y. enterocolitica* und dem angeborenen Immunsystem wurde schon vielfach untersucht. DCs sind professionelle APCs, welche eine Schlüsselrolle in der Abwehr einer Yersinien-Infektion spielen. Nichtsdestotrotz ist sehr wenig über die Wechselbeziehung zwischen *Y. enterocolitica* mit DCs bekannt. *Y. enterocolitica* ist ein durch Nahrungsmittel übertragener Erreger, der chronische und akute Erkrankungen des gastrointestinalen Systems verursacht. Nach der oralen Aufnahme wird *Y. enterocolitica* über die M-Zellen in die Peyer-Plaques aufgenommen und verbreiten sich weiter in Leber und Milz. Obwohl sich Yersinien in infiziertem Gewebe überwiegend extrazellulär befinden, sind T-Zellen essentiell für die Überwindung der Infektion. I. B. Autenrieth *et al.* haben die Bedeutung von T-Zellen und inflammatorischen Zytokinen bei der Eradikation von *Y. enterocolitica* in mehreren Studien dargestellt.^{193, 194, 200} Betrachtet man die wichtige Rolle der DCs in der Initiierung und Regulation der adaptiven Immunabwehr und der T-Zell-Antwort^{11, 237}, ist es nicht verwunderlich, dass Yersinien Strategien entwickelt haben, um die Erkennung durch DCs zu umgehen. Nicht nur in der Regulation der adaptiven Immunabwehr spielen DCs eine Rolle. Sie beeinflussen ebenfalls die Funktion der angeborenen Immunabwehr. Es gibt Hinweise auf eine komplexe Beeinflussung des Phagozyten-Gleichgewichts durch DCs. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten eine bessere Kontrolle der Yersinien-Infektion bei der Depletion von DCs vor der Infektion.²³⁸ In DC depletierten Mäusen wurden eine erhöhte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und eine bessere Befähigung zur Bakterientötung beobachtet.

Y. enterocolitica kann dank seines TTSS eine Reihe von Effektorproteinen (Yops) in Wirtszellen einschleusen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass DCs neben B-Zellen, neutrophilen Granulozyten und MF ebenfalls Ziel dieser Effektorproteine sind. Mehrere Arbeiten wiesen die Hemmung der phagozytischen Aktivität und Antigenpräsentation von DCs durch Yops nach.^{239, 240} S. E. Autenrieth *et al.* zeigten ebenfalls eine Hemmung der Antigenaufnahme in DCs durch YopP.²³⁰ Auf diesem

Weg kann *Y. enterocolitica* nicht nur die angeborene, sondern auch die adaptive Immunabwehr beeinflussen. Durch die eingeschränkte Funktion der DCs und anderer Immunzellen wird die T-Zell-Aktivierung gehemmt. Trülsch *et al.* erwiesen eine verringerte CD8⁺-T-Zell-Aktivierung durch YopP.²¹⁰ Es bleibt jedoch fraglich, ob die Hemmung der phagozytischen Aktivität und Antigenprozessierung von DCs durch Yops bei der verminderten T-Zell-Aktivität eine bedeutende Rolle spielt. Die verringerte T-Zell-Aktivierung könnte ebenfalls auf die Induktion der Apoptose von DCs und die Hemmung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch YopP zurückzuführen sein.^{231, 241}

Ein weiterer Ansatz ist die Untersuchung der verschiedenen DC-Subtypen und ihrer Aufgaben bei der Immunantwort auf *Y. enterocolitica*. Es werden drei Subtypen von DCs unterschieden, CD8α⁺-, CD4⁺- und CD8α⁻-CD4⁻-DCs. S. E. Autenrieth *et al.* erkannten die Wichtigkeit der CD4⁺-DCs bei der Kontrolle einer Infektion von Mäusen mit *Y. enterocolitica*.²²⁹ Unsere Arbeitsgruppe untersuchte die Beeinflussung von verschiedenen DC-Subtypen bei einer Yersinien-Infektion *in vivo* und fand eine verminderte Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung von CD8α⁺-DCs, jedoch nicht der anderen beiden Subtypen.²²⁹ CD8α⁺-DCs verstärken die Immunantwort von CD4⁺-T_H1-Zellen, welche essentiell ist um den Erregern Einhalt zu gebieten. Außerdem wurde eine verminderte Antigenaufnahme und -prozessierung sowie Zytokinproduktion bei CD8α⁺-DCs beobachtet, wohingegen die Antigenaufnahme der anderen Subtypen zunahm. Da CD8α⁺-DCs derjenige Subtyp mit der effektivsten Antigenaufnahme in der Milz ist⁶⁴, könnten sie durch die vermehrte Injektion von Yops gleichfalls am stärksten in ihrer Funktion gehemmt werden. Ein zusätzlicher Aspekt in der Wechselwirkung von *Y. enterocolitica* und DCs ist die Induktion der Reifung von DCs durch Yersinien. Unserer Arbeitsgruppe fand eine vermehrte Reifung von allen DC-Subtypen *in vivo* nach der Infektion, jedoch eine Reduktion von reifen DCs am dritten Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*.²²⁹ Dagegen wurde bei der *in vitro* Infektion eine Hemmung der DC-Reifung beobachtet.²³¹ Dieser Unterschied kann mit einer geringeren Yop Injektion *in vivo* erklärt werden. Bisher wurde lediglich eine erhöhte Expression von Reife-Markern als Reaktion auf eine Bakterieninfektion beobachtet. Die Da-

ten lassen vermuten, dass *Y. enterocolitica* zunächst ebenfalls eine Reifung von DCs induziert, diese in einem nächsten Schritt jedoch durch Effektorproteine hemmt. Andererseits könnte die reduzierte Expression von Reife-Markern auch aufgrund des gesteigerten Umsatzes und der Rekrutierung von unreifen DCs zustande kommen. Wie die Selektion der DC-Subtypen zustande kommt und welche Funktionen dabei eine Rolle als Angriffspunkte zur Schwächung der körpereigenen Abwehr spielen, bleibt Inhalt weiterer Untersuchungen. Auch bleibt zu ergründen, inwiefern eine Yop-Injektion in T-Lymphozyten einen direkten Effekt auf die Proliferation und Reifung dieser Zellen hat.

In dieser Arbeit wurde die Wechselbeziehung zwischen *Y. enterocolitica* und DCs mit bildgebenden Maßnahmen untersucht. Zielstruktur war in diesem Fall die Milz, welche als zentrales lymphatisches Organ einen Schauplatz für das Zusammentreffen von Yersinien und Immunzellen bietet. Hierdurch erhoffte man sich, die komplexen Vorgänge bei einer Immunantwort auf *Y. enterocolitica* besser nachvollziehen zu können. Konkrete Untersuchungskriterien waren: (1) Die Lokalisation von DCs innerhalb der Milzstrukturen im Verlauf einer Infektion mit *Y. enterocolitica*; (2) die Anzahl der DCs und die Abszessbildung in der Milz im Verlauf einer Yersinien-Infektion; (3) die Darstellung der Interaktion von DCs und Yersinien sowie der Nachweis von intrazellulären Yersinien *in vivo*.

4.1 Verteilung der DCs in der Milz während einer Infektion mit *Y. enterocolitica*

Die Milz ist ein Organ des lymphatischen Systems und spielt eine große Rolle in der Abwehr körperfremder Stoffe. Nach einer enteralen Infektion mit *Y. enterocolitica* befallen die Bakterien ebenfalls Leber und Milz. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Yersinien über den Blutweg zuerst die PFZ und MZ der Milz erreichen. Sie gelangen über die Trabekelarterien, die Zentralarterien und ihre abgehende Arteriolen und schließlich in die Pulpastränge der PFZ und MZ (siehe Abb. 7). DCs gehören zu den

APCs, welche sich in der Milz überwiegend in der MZ der LF befinden. Dort filtern sie Bakterien und Antigene aus dem Blut heraus, um diese anschließend auf ihrer Zelloberfläche mittels MHC-II-Molekülen T-Zellen zu präsentieren. Zusätzlich findet eine Einwanderung von peripheren DCs statt, die im Gewebe durch Pathogene aktiviert wurden. Durch ihre Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren, spielen DCs eine essentielle Rolle in der Immunabwehr von *Y. enterocolitica*.^{193, 194} Da T-Zellen über die MZ in die PALS einwandern, kommen sie auf diesem Weg mit APCs in Kontakt. Außerdem wird angenommen, dass DCs nach ihrer Aktivierung in die T-Zell-Zone einwandern und dort eine große Anzahl von T-Zellen zur Ausreifung und Differenzierung zu bringen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits eine DCs-Migration von der MZ in die PALS, nach ihrer Aktivierung durch pathogene Keime, fluoreszenzmikroskopisch untersucht. De Smedt *et al.* zeigten die überwiegende Lokalisation von DCs in der MZ bei nichtinfizierten Mäusen und einen Wechsel von DCs in die PALS, 6 Stunden nach Behandlung mit dem Bakterienprodukt LPS.⁵⁶ Muraille *et al.* konnten eine Migration von DCs in die PALS nach einer Infektion mit lebenden *L. monocytogenes*, jedoch nicht nach Behandlung mit hitzegetöteten *L. monocytogenes*, nachweisen.²¹⁹ Es fand also nur bei einer Infektion mit Bakterienstämmen, welche eine protektive Immunantwort auslösen, eine Migration von DCs in die T-Zell-Zone statt. Aoshi *et al.* fanden ebenfalls eine Migration von DCs in die PALS, 9 Stunden nach einer Infektion mit *L. monocytogenes*.²¹⁸

In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine Veränderung der Verteilung von DCs in der Milz, während einer Infektion mit *Y. enterocolitica*, gezeigt. Eine Migration von DCs in die PALS findet 6 Stunden nach einer Infektion mit dem pYV⁺-Wildstamm von *Y. enterocolitica* statt. Bei PBS behandelten Mäusen befanden sich DCs überwiegend in der MZ und PFZ und zu einem geringen Teil in der PALS- bzw. T-Zell-Region. Demgegenüber kehrte sich einen Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* diese Verteilung genau um. Die DCs waren nun in der PALS und weniger in der MZ und PFZ zu finden. Mit Hilfe einer Infektionsreihe wurde der genaue Zeitpunkt des Wechsels von DCs in die PALS bestimmt. Die Verteilung von DCs änderte sich 6 Stunden nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Die DCs waren bis 3 Stunden nach der Infektion

überwiegend in der MZ und PFZ lokalisiert. Nach 6 Stunden befanden sie sich zum Großteil in der PALS- bzw. T-Zell-Region.

Die Beobachtungen von Muraille und Aoshi *et al.*, dass Bakterien in Anwesenheit von CD11c⁺-Zellen in die PALS übergehen, konnten mit Yersinien nicht bestätigt werden. Dies mag daran liegen, dass Yersinien im Gegensatz zu *L. monocytogenes* überwiegend extrazelluläre Bakterien sind. Muraille *et al.* fanden sowohl lebende als auch abgetötete *L. monocytogenes* überwiegend intrazellulär von MF und weniger in DCs. Ihrer Meinung nach könnten die Bakterien durch Wanderung mittels Aktinpolymerisation oder durch infizierte MF in die T-Zell-Zone gelangen. Aoshi *et al.* beobachteten, dass der Befall der PALS durch *L. monocytogenes* die Anwesenheit von CD11c⁺-Zellen benötigte und die Bakterien nicht selbstständig in die PALS-Region einwanderten. In unseren Versuchen waren Yersinien bis zu 12 Stunden nach der Infektion in steigender Anzahl in der MZ zu finden. Die MZ und PFZ stellen den Übergang von der WP zur blutreichen RP dar. Dort enden zahlreiche Arteriolen, welche von Zentralarterien und Trabekelararterien gespeist werden. Die Yersinien gelangen zuerst mit dem Blut in die PFZ und MZ, wo sie um die LF angeordnet bis 12 Stunden nach der Infektion zu sehen sind. Bis zu diesem Zeitpunkt konnten wir keine Migration von Yersinien in die PALS beobachten. Allerdings waren 24 Stunden nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* kleine Abszesse sowohl in der PALS als auch in der MZ zu finden (siehe Abb. 9 und 10). Daher muss die Einwanderung von Yersinien in die PALS zwischen 12 und 24 Stunden nach der Infektion stattgefunden haben. Ob dies durch Transport von intrazellulären Bakterien geschieht oder durch eine Wanderung von Yersinien entlang der Milzstrukturen, kann nur vermutet werden. Auf welchem Weg Yersinien in die PALS gelangen und ob sie durch DCs oder MF dorthin gelangen, bleibt Inhalt weiterer Untersuchungen. So könnte der Zeitraum 12 bis 24 Stunden nach der Infektion mit einer Yersinien- und DC-Fluoreszenzfärbung untersucht werden. Die Rolle von MF bei dem Übertritt von Yersinien in die PALS könnte mittels Mac-3 Färbung verdeutlicht werden.

Ein Schwachpunkt der oben genannten Beobachtungen ist sicherlich die genaue Definition der unterschiedlichen Milzstrukturen und Zellareale. In dieser Arbeit wurde

die PALS- bzw. T-Zell-Zone mittels DAPI-Kernfärbung und der sichtbaren Struktur der LF bestimmt (siehe Abb. 7 bis 10). Zelldichte Areale wurden als GC und B-Zell-Zone definiert, zellärmere Areale um die Zentralarteriole als T-Zell-Zone. Das unmittelbare Gebiet um den LF wurde als MZ festgelegt, an welche sich weiter in der Peripherie die PFZ anschließt. Um die PALS genauer einzugrenzen, könnte eine T-Zell-Fluoreszenzfärbung angewendet werden. Andere Arbeitsgruppen verwendeten anstelle von einer DAPI-Kernfärbung eine Phalloidin-Färbung, welche zelluläres Aktin markiert.^{218, 219}

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Verteilung der DC-Subpopulationen während einer Yersinien-Infektion. In dieser Arbeit wurde deshalb der Versuch unternommen, eine CD8 und CD4 spezifische Fluoreszenzfärbung zu etablieren, was jedoch zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen führte. Eine Etablierung dieser Färbungen gemeinsam mit einer Yersinien- und DC-Fluoreszenzfärbung wäre für die Zukunft wünschenswert.

4.2 Einfluss einer *Y. enterocolitica* Infektion auf die Anzahl der DCs und Abszessbildung innerhalb der Milz.

Eine wichtige Eigenschaft von *Y. enterocolitica* um die Immunabwehr des Wirtes zu umgehen, ist das TTSS, über welches eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren (siehe Tab. 1 und 2) in eukaryontische Zellen eingebracht werden. Sie beeinflussen die Immunantwort auf verschiedenen Ebenen. Durch Blockade von Transkriptionsfaktoren wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in Phagozyten gehemmt. In DCs wirken die Pathogenitätsfaktoren inhibierend auf Proliferation, Reifung, Antigenaufnahme und -prozessierung.²³⁰⁻²³² Zudem kann die Apoptose eingeleitet werden.^{183, 231} Vorausgegangene Versuche der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass eine Infektion mit *Y. enterocolitica* eine Reduktion der Anzahl von CD8 α^+ - und CD4 $^+$ -DCs in der Milz bewirkt.²²⁹ In mit LPS behandelten oder mit *E.coli* infizierten Mäusen konnte ebenfalls eine Verringerung der DC-Zahl in der Milz beobachtet werden.^{56, 242}

Bei einer Yersinien-Infektion wird die Reduktion der DCs zum Großteil von Virulenzfaktoren des Bakteriums verursacht. Die Auswanderung von DCs in die Peripherie und die Hemmung der Immunantwort durch regulatorische Mechanismen spielen hier eine untergeordnete Rolle. Die Virulenzfaktoren führen zum Zelltod von DCs und bewirken eine Hemmung der Proliferation und Generierung von DCs. Dennoch gibt es effektive Wege, über welche das Immunsystem stimuliert und die Infektion aufgehalten werden kann. Einer dieser Aktivierungswege sind die TLRs. Sie sind membranständige Rezeptoren welche an PAMPs auf Bakterien binden und von verschiedenen Immunzellen, darunter auch DCs, exprimiert werden. Da TLRs und ihre Adaptermoleküle MyD88 und TRIF eine wichtige Funktion bei der Einleitung der Immunantwort auf *Y. enterocolitica* einnehmen und über ihren Einfluss auf den Infektionsverlauf nur wenig bekannt ist, wurde in dieser Arbeit die Abszessbildung und DC-Zahl in entsprechenden Knockout Mäusen untersucht.

Vorausgegangene FACS-Messungen unserer Arbeitsgruppe ergaben eine Reduktion CD8 α ⁺- und CD4⁺-DCs in der Milz von C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäusen um bis zu 80% am dritten Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*.²²⁹ In vorliegender Arbeit ließ sich dies fluoreszenzmikroskopisch für Wildtyp-Mäuse (C57BL/6 und 129Sv) und MyD88^{-/-} Mäusen nachvollziehen. Am dritten Tag nach der Infektion war eine deutliche Reduktion CD11c⁺-DCs sichtbar (siehe Abb. 17, 19 und 22). Analog zur verringerten DC-Anzahl fand sich eine starke Abszessbildung in diesen Mausstämmen. Die stärkste Abszessbildung war in MyD88^{-/-} Mäusen vorhanden (siehe Abb. 19). Hier war auch im FACS der größte Reduktion von DCs sichtbar. Die ebenfalls von unserer Arbeitsgruppe mittels FACS untersuchten Mausstämme TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-} und TRIF^{-/-} wiesen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen und Myd88^{-/-}-Mäusen während der Infektion und im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen eine annähernd gleichbleibende Anzahl von DCs auf.²²⁹ Auch diese Beobachtungen konnten in vorliegender Arbeit untermauert werden. Fluoreszenzmikroskopisch war die Anzahl von CD11c⁺-Zellen in TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}- und TRIF^{-/-}-Mäusen am dritten Tag nach der Infektion nur mäßig verringert (siehe Abb. 20 und 21). Bei TRIF^{-/-}-Mäusen nahmen die Abszesse die geringste Fläche ein (siehe Abb. 21). TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäuse zeigten weniger Abszesse als Wildtyp-

Mäuse und MyD88^{-/-}-Mäuse. TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäuse wurden auf einem C57BL/6 x 129Sv Hintergrund gezüchtet, weshalb die Wildtyp-Mäuse 129Sv und C57BL/6 in dieser Arbeit als Kontrolle untersucht wurden. Interessanterweise lagen die Werte für Fläche und Umfang der Abszesse von TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäusen zwischen den Werten von C57BL/6- und 129Sv-Mäusen (siehe Tab. 7). Die histologischen Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Abszessbildung und DC-Zahl stützen also Erkenntnisse aus voran gegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe.²²⁹ Die geringe Abszessbildung und hohe Anzahl an CD11c⁺-DCs am dritten Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* in TRIF^{-/-}- und TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäusen bekräftigt, dass der Verlust von CD8α⁺- und CD4⁺-DCs über die Signalwege TLR2, TLR4 und TRIF beeinflusst wird. Die extrem starke Abszessbildung und dezimierte CD11c⁺-DC-Zahl in MyD88^{-/-}-Mäusen, spricht für eine tragende Rolle dieses Adaptermoleküls bei der effektive Immunabwehr einer Yersinien-Infektion.

In vorliegender Arbeit wurden nur CD11c⁺-DCs fluoreszenzmikroskopisch untersucht und nicht weiter in die Subpopulationen CD8α⁺-, CD4⁺- und CD8α⁻-CD4⁻-DCs unterteilt. Die Ansätze, CD8α und CD4 spezifische Fluoreszenzfärbung zu etablieren, erbrachten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Es wäre also von Interesse, diese Fluoreszenzfärbungen zu etablieren und an verschiedenen Infektionszeitpunkten die DC-Zahl in den unterschiedlichen Knockout-Mäusen zu untersuchen. So würde man bei einer CD4⁺-CD8α⁺-Fluoreszenzmarkierung eine stark verminderte Anzahl an CD4⁺- und mäßig verminderte Anzahl an CD8α⁺-DCs in MyD88^{-/-} und Wildtyp-Mäusen erwarten. In TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}- und TRIF^{-/-}-Mäusen würde dagegen eine weitgehend normale Anzahl an CD8α⁺- und CD4⁺-DCs zu finden sein. Hier ist der Vergleich mit PBS behandelten Mäusen bedeutsam. Außerdem wären weitere Untersuchungen mittels FACS von Wildtyp-Mäusen zu frühen Infektionszeitpunkten denkbar, um diese mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit vergleichen zu können.

4.3 Interaktion Yersinien und DCs

Yersinien interagieren mit DCs und vermindern ihre Fähigkeit der T-Zell-Aktivierung.^{210, 231} Der in dieser Arbeit verwendete Wildtypstamm besitzt das Virulenzplasmid pYV, welches Yersinien die Fähigkeit verleiht, das TTSS auszubilden. Yersinien binden mittels des Adhäsins YadA an Integrine auf der Zelloberfläche und durch den Injektionsapparates können Effektorproteine/Yops in die Zelle gelangen. Die Yops wirken hemmend auf Phagozytose, Antigenprozessierung, Zytokinproduktion und Differenzierung der DCs.²³⁰⁻²³² Es ist ebenfalls erwiesen, dass sie die Apoptose in DCs einleiten können.^{183, 241}

Die Interaktion von *Y. enterocolitica* und DCs wurde bereits *in vitro* von Adkins *et al.* fluoreszenzmikroskopisch dargestellt.²³² In dieser Arbeit konnte ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch eine Interaktion bzw. ein direkter Kontakt zwischen CD11c⁺-DCs und *Y. enterocolitica* *in vivo* gezeigt werden. Am eindrucksvollsten und häufigsten ist dies 30 Minuten und 3 Stunden nach der Infektion zu sehen (siehe Abb. 26, 27, 32 und 33), da sich zu diesen frühen Zeitpunkten der Infektion einzelne Yersinien zusammen mit DCs in der MZ befinden. An späteren Zeitpunkten sind Yersinien überwiegend in Kolonien bzw. Abszessen zu finden. Es besteht eine größere räumliche Distanz zwischen Bakterien und DCs, da diese in die T-Zell-Zone migrieren. Nichtsdestotrotz sind auch hier Interaktionen zwischen DCs und Yersinien zu finden. Als schwierig erwies sich die Darstellung von intrazellulären Yersinien. Es konnte ein unmittelbarer Kontakt von Yersinien und DCs dargestellt werden. Jedoch erwies sich in der Ansicht aus verschiedenen Schnittebenen die Bestimmung der genauen Lokalisation von Yersinien als schwierig. Die verwendeten Cryoschnitte sind mit 5 µm sehr dünn, dennoch ist eine Überlagerung von Yersinien und DCs nicht auszuschließen. Dieses Problem stellt sich in der *in vitro* Infektion von DCs mit Yersinien nicht. Adkins *et al.* konnten mit dem Konfokalmikroskop *in vitro* zahlreiche intrazelluläre Yersinien nachweisen.²³² Extrazelluläre Yersinien wurden mittels Gentamicin-killing-assay beseitigt. Außerdem ist bei einer *in vitro* Untersuchung die Anzahl an möglichen Interaktionen und damit an intrazellulären Yersinien erheblich größer. In der Milz ist durch

den großen Raum und die unterschiedlichen Kompartimente nur in bestimmte Gebiete eine Interaktion möglich und das, wie zuvor beschrieben, auch nur zu bestimmten Zeitpunkten der Infektion. Ein weiterer Grund für das Fehlen von intrazellulären Yersinien *in vivo* könnte die Verwendung des virulenten Yersinien Wildstamms pYV⁺ sein. Adkins *et al.* sahen *in vitro* eine um 25% geringere Anzahl an intrazellulären Bakterien bei der Infektion von DCs mit pYV⁻ als mit pYV⁺-Yersinien.²³² Dies bestätigt die Annahme, dass pYV⁺ die Phagozytose und Bakterienaufnahme von DCs hemmt.²⁴⁰

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von Yersinien und DCs nur in C57BL/6-Mäusen zu frühen Infektionszeitpunkten untersucht. In 129Sv-Mäusen und den Knockout-Mäusen MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-} und TLR2^{-/-}x4^{-/-} wurde die Interaktion lediglich am dritten Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* untersucht. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion ist die Abszessbildung in der Milz besonders in Wildtyp-Mäusen und MyD88^{-/-}-Mäusen weit fortgeschritten und nur wenige Interaktionen zu finden. Aber auch bei TRIF^{-/-}- und TLR2^{-/-}x4^{-/-}-Mäusen, welche weniger Abszesse aufweisen, ist nur eine geringe Zahl an Interaktionen am dritten Tag nach der Infektion sichtbar. Es wäre von Interesse die Interaktion in diesen Mausstämmen zu frühen Infektionszeitpunkten zu untersuchen. Eine verringerte Anzahl von Interaktionen zu frühen Zeitpunkten der Infektion könnte einen Hinweis darauf geben, dass die TLRs und ihre Adaptermoleküle die Interaktion zwischen Yersinien und DCs beeinflussen. Eine Schwierigkeit wird dabei sein, die Anzahl von Interaktionen objektiv zu bestimmen.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Wechselwirkung zwischen DCs und *Y. enterocolitica* histologisch untersucht. Die Erforschung der Wechselwirkung von DCs und verschiedenen Pathogenen ist wichtig, um zu verstehen wie effektive Immunität erreicht werden kann und könnte neue Erkenntnisse für die Entwicklung neuer Impfstoffe bringen.

Es konnte eine Migration von DCs in die PALS bzw. T-Zell-Region 6 Stunden nach Infektion mit dem pYV⁺ Wildstamm von *Y. enterocolitica* gezeigt werden. Während sich die DCs in PBS-behandelten Mäusen überwiegend in der MZ befanden. Im Vergleich zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wurde jedoch keine Migration von Yersinien in die PALS in Anwesenheit von DCs beobachtet. Yersinien befinden sich zu frühen Infektionszeitpunkten in der MZ, wo sie in die Milz eingetreten sind. Allerdings sind einen Tag nach der Infektion Abszesse sowohl in der MZ als auch in der PALS zu finden. Es bleibt Inhalt weiterer Untersuchungen, ob die überwiegend extrazellulären Yersinien durch intrazellulären Transport oder eigenständig in die T-Zell-Region gelangen und zu welchem Zeitpunkt der Infektion dies geschieht.

Weiterhin konnte ein direkter Kontakt zwischen CD11c⁺-DCs und *Y. enterocolitica* *in vivo* gezeigt werden. Zu sehen sind diese Interaktionen gehäuft 30 Minuten und 3 Stunden nach der Infektion und in geringem Ausmaße zu späteren Infektionszeitpunkten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich Yersinien und DCs bis 6 Stunden nach der Infektion gemeinsam in der MZ befinden und zu späteren Zeitpunkten bereits der Wechsel von DCs in die T-Zell Zone stattgefunden hat. Daher stellt sich die Frage, ob DCs in der Frühphase der Infektion häufiger mit Pathogenitätsfaktoren injiziert werden als zu späteren Zeitpunkten, wenn die Interaktion von Yersinien mit DCs deutlich geringer ist. Dies könnte mit Hilfe eines Reportersystems untersucht werden.²³⁹ Da die Interaktion in Knockout-Mäusen nur zu späten Zeitpunkten der Infektion untersucht wurde, wäre für die Zukunft eine Untersuchung der Interaktion zu frühen Zeitpunkten der Infektion mit *Y. enterocolitica* von Interesse. Hier könnte eine verringerte Anzahl von Interaktionen ein Hinweis auf die Beeinflussung der Interaktion durch TLRs und ihre Adaptermoleküle geben. Ein eindeutiger Nachweis von intrazellulären Yersinien konnte in dieser Arbeit nicht erbracht werden, da die Anzahl an Interaktionen *in vivo* relativ gering ist und bei 5 µm dicken Cryoschnitte eine Überlagerung von Yersinien und DCs möglich ist. Ein Grund für eine verminderte Anzahl an intrazellulären Yersinien könnte die Hemmung der Phagozytose durch das Virulenzplasmid pYV⁺ des verwendeten Yersinien Wildstamms sein.

Aufgrund von vorherigen FACS-Analysen der Arbeitsgruppe, welche einen Rückgang verschiedener DC-Subtypen während einer Yersinien-Infektion zeigten wurde in dieser Arbeit die Anzahl von DCs sowie die Abszessbildung in verschiedenen Mausstämmen untersucht. Es konnte eine Verringerung der Anzahl von DCs am dritten Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* in Wildtyp-Mäusen und MyD88^{-/-}-Mäusen fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden. Zusätzlich wurde die Abszessbildung in unterschiedlichen Knockout-Mäusen verglichen und eine analog zur verringerten DC-Anzahl starke Abszessbildung in Wildtyp-Mäusen und MyD88^{-/-}-Mäusen gesehen. Die stärkste Abszessbildung war in MyD88^{-/-}-Mäusen vorhanden. Dies spricht für den wichtigen Einfluss des Adapterproteins MyD88 auf zelluläre Vorgänge, welche essentiell für die Immunabwehr von *Y. enterocolitica* sind. Wie zuvor in der FACS-Untersuchung gesehen, bestätigt sich in dieser Arbeit die annähernd gleichbleibende Anzahl von DCs bei den Mausstämmen TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-} und TRIF^{-/-} nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Die geringe Abszessbildung und hohe Anzahl von DCs in TRIF^{-/-}- und TLR2^{-/-}xTLR4^{-/-}-Mäusen bestätigt die Theorie der Beeinflussung des Verlusts von CD8a⁺- und CD4⁺-DCs über die Signalwege TLR2, TLR4 und TRIF. Die FACS-Analyse zeigte einen Unterschied im Rückgang der verschiedenen DC-Subpopulationen während einer Yersinien-Infektion. In dieser Arbeit konnten die verschiedenen DC-Subtypen jedoch nicht dargestellt werden. Die Etablierung einer CD8a und CD4 spezifischen Fluoreszenzfärbung könnte Ziel weiterer Versuche sein.

Abschließend muss betont werden, dass die Histologie nur einen sehr kleinen Teil der Forschungsmöglichkeiten im Zusammenspiel zwischen *Y. enterocolitica* und DCs darstellt und deshalb in ihrer Aussagekraft limitiert ist. Nichts desto trotz ist sie ein sehr anschauliches Mittel mit großer Beweiskraft, wenn sie mit anderen Methoden kombiniert werden kann.

5 Zusammenfassung

DCs sind spezialisierte APCs und stellen eine wichtige Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr dar. Sie spielen eine tragende Rolle in der Initiierung der T-Zell-Antwort, was sie zum idealen Ziel für Krankheitserreger macht. *Y. enterocolitica* ist ein extrazelluläres Bakterium, welches durch Nahrungsmittel übertragen wird und akute sowie chronische Gastroenteritis verursacht. *Y. enterocolitica* kann über ein spezielles Sekretionssystem Effektorproteine in Zielzellen wie Makrophagen, DCs, Granulozyten und B-Lymphozyten einbringen und dadurch die Immunantwort umgehen. Da DCs nicht nur die Immunantwort, sondern auch die Bildung des Immungedächtnisses maßgeblich beeinflussen, sind sie von besonderem Interesse für die Erforschung und Entwicklung neuer wirksamer Impfstoffe. Außerdem ist *Y. enterocolitica* mit der Fähigkeit Proteine direkt in Immunzellen zu injizieren ein hoffnungsvoller Kandidat, als Träger von Impfstoffen oder Adjuvant zu fungieren. Bis dahin gilt es, die Interaktion zwischen *Y. enterocolitica* und DCs sowie die Wirkungsweise der Effektorproteine auf die Funktion der DCs zu ergründen.

In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die bildliche Darstellung der Wechselwirkung zwischen DCs und *Y. enterocolitica* gelegt. Verschiedene Mausstämme wurden mit *Y. enterocolitica* infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion Cryoschnitte der Milz angefertigt. Yersinien, DCs und Zellkerne wurden mittels Fluoreszenzfärbung markiert und die Milzschnitte mit dem Mikroskop nach Abszessbildung, Verteilung der DCs und ihrer Interaktionen mit Yersinien beurteilt. Es stellte sich heraus, dass sich die Verteilung der DCs zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion verändert und die DCs von der MZ in die T-Zell Zone übergehen. Wohingegen die Yersinien in der MZ um die LF angeordnet verbleiben und dort und in der PALS später Abszesse bilden. Der unmittelbare Kontakt zwischen Yersinien und DCs konnte am eindrücklichsten zu frühen Zeitpunkten der Infektion gezeigt werden. Intrazelluläre Bakterien waren jedoch nicht eindeutig darstellbar. Der Verlauf der Yersinien-Infektion wurde anhand der Abszessbildung und Anzahl der DCs in unterschiedlichen TLR bzw. TLR-Adapter defizienten Mausstämmen beurteilt. Die

immunhistologische Untersuchung von TLR2xTLR4, TRIF und MyD88 defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bestätigte FACS-Untersuchungen, die den Verlust von CD8 α^+ - und CD4 $^+$ -DCs über die Signalwege TLR4 und TRIF im Verlauf einer Yersinien-Infektion zeigten.

Diese Arbeit veranschaulicht das Zusammentreffen von DCs mit *Y. enterocolitica* in der Milz. Nicht nur der Kontakt zwischen Yersinien und DCs, sondern auch die anschließende Migration von DCs in die T-Zell-Zone konnte bildlich dargestellt werden. Außerdem wurde der Einfluss von TLRs und ihren Zellmediatoren auf den Verlauf einer Yersinien-Infektion untersucht. Dieses Bildmaterial leistet ein Beitrag, der zum Verständnis der Rolle von DCs im Zusammenspiel mit unserem Immunsystem und Pathogenen nötig ist.

6 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
CFU	Koloniebildende Einheiten (Colony forming units)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DC	Dendritische Zelle
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fötale Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung
GC	Keimzentrum (Germinal center)
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL	Interleukin
INF	Interferon
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
LF	Lymphfollikel
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MBL	Mannose bindendes Lectin
MF	Makrophagen
MHC	Major histocompatibility complex
MyD88	Myeloid differentiation factor
MZ	Marginalzone
NaCl	Natriumchlorid
NGS	Normales Ziegen Serum
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OT	Objektträger

PALS	Periarterielle Lymphe
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFZ	Parafollikuläre Zone
PFA	Paraformaldehyd
PPR	Pattern-recognition receptor
pYV ⁺	Plasmid tragend
Rho	Ras homolog gene family member
Rmp	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
RP	Rote Pulpa
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler (Standard Error of the Mean)
SPF	Spezifiziert pathogen frei
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T _{reg} -Zellen	Regulatorische T-Zellen
TRIF	TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTSS	Das Typ III Sekretionssystem
Ye	<i>Yersinia enterocolitica</i>
YopP	Yersinia outer Protein P
WP	Weißer Pulpa

6.1 Einheiten und Größenordnungen

Å	Ångström
C°	Grad Celsius
g	Gram
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
m	Milli
M	molar, Mol/l ⁻¹
min	Minute
n	Nano
s	Sekunden
μ	Mikro

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Der Lebenszyklus einer DC.....	11
Abb. 2:	Signalwege zur DC-Aktivierung.....	14
Abb. 3:	Übersicht verschiedener TLRs.....	18
Abb. 4:	Bindungsmoleküle zwischen T-Zelle und APC.....	21
Abb. 5:	Rolle der CD4-T-Zelle bei der Kostimulation.....	22
Abb. 6:	Struktur des Injektosom und Injektion von Yops in die Zielzelle.....	27
Abb. 7:	Die Struktur des lymphatischen Gewebes in der Milz.....	32
Abb. 8:	Die Verteilung von CD11c ⁺ DCs einen Tag nach Injektion von PBS.....	49
Abb. 9:	Die Verteilung von CD11c ⁺ DCs einen Tag nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	50
Abb. 10:	Die Verteilung von CD11c ⁺ DCs einen Tag nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	50
Abb. 11:	Die Verteilung von CD11c ⁺ DCs drei Tage nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	51
Abb. 12:	Die Verteilung von CD11c ⁺ DCs 30 Minuten nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	52
Abb. 13:	Die Verteilung von CD11c ⁺ DCs 3 Stunden nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	53
Abb. 14:	Die Verteilung von CD11c ⁺ DCs 6 Stunden nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	54

Abb. 15:	Die Verteilung von CD11c ⁺ DCs 12 Stunden nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	55
Abb. 16:	Vergleich der Verteilung von CD11c ⁺ -DCs 30 min, 3 h, 6 h, 12 h und einen Tag nach der Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	56
Abb. 17:	Die Abszessbildung in C57BL/6 Mäusen drei Tage nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	58
Abb. 18:	Die Abszessbildung in C57BL/6 Mäusen einen, zwei und drei Tage nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	69
Abb. 19:	Die Abszessbildung in Myd88 ^{-/-} Mäusen drei Tage nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	60
Abb. 20:	Die Abszessbildung in TRIF ^{-/-} Mäusen drei Tage nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	61
Abb. 21:	Die Abszessbildung in TLR2 ^{-/-} xTLR4 ^{-/-} Mäusen drei Tage nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	62
Abb. 22:	Die Abszessbildung in 129Sv Mäusen drei Tage nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	63
Abb. 23:	Vergleich der Abszessbildung in den unterschiedlichen Mausstämmen drei Tage nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	64
Abb. 24:	Vergleich der Abszessbildung in den unterschiedlichen Mausstämmen drei Tage nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	65
Abb. 25:	Abszessfläche der untersuchten Mausstämme am dritten Tag nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	66

Abb. 26:	Abszessumfang der untersuchten Mausstämme am dritten Tag nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	67
Abb. 27:	Die Interaktion in C57BL/6 Mäusen 30 Minuten nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	69
Abb. 28:	Die Interaktion in C57BL/6 Mäusen 3 Stunden nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	69
Abb. 29:	Die Interaktion in C57BL/6 Mäusen 6 Stunden nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	70
Abb. 30:	Die Interaktion in C57BL/6 Mäusen 12 Stunden nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	71
Abb. 31:	Die Interaktion in C57BL/6 Mäusen einen Tag nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	72
Abb. 32:	Die Interaktion in Myd88 ^{-/-} , TLR2x4 ^{-/-} , TRIF ^{-/-} und 129Sv Mäusen drei Tage nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	73
Abb. 33:	Die Interaktion in C57BL/6 Mäusen 30 Minuten und 3, 6 und 12 Stunden nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	74
Abb. 34:	Die Interaktion in C57BL/6 Mäusen 30 Minuten und 3 Stunden nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	75

Tab. 1:	Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren von enteropathogenen <i>Yersinia</i> -Spezies.....	24
Tab. 2:	Plasmid kodierte Pathogenitätsfaktoren von enteropathogenen <i>Yersinia</i> -Spezies.....	26
Tab. 3:	Übersicht der verwendeten Antikörper.....	38
Tab. 4:	Übersicht der Sekundärantikörper.....	38
Tab. 5:	Emissionsmaxima der Fluorochrome.....	46
Tab. 6:	Die Infektionsdosis, Bakterienlast und das Milzgewicht der untersuchten Mausstämme am dritten Tag nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	63
Tab. 7:	Abszessfläche und -umfang der untersuchten Mausstämme am dritten Tag nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	66

8 Referenzen

1. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006; **6**(3): 173-82.
2. Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol.* 2008; **15**: 118-46.
3. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *AnnuRevImmunol.* 2000; **18**: 767-811.
4. Kersey JH, Gajl-Peczalska J. T and B lymphocytes in humans. A review. *Am J Pathol.* 1975; **81**(2): 446-58.
5. Bjorck P. The multifaceted murine plasmacytoid dendritic cell. *Hum Immunol.* 2002; **63**(12): 1094-102.
6. Benko S, Magyarics Z, Szabo A, Rajnavolgyi E. Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: the emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors. *Biol Chem.* 2008; **389**(5): 469-85.
7. Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *SeminImmunol.* 2005; **17**(4): 253-61.
8. Schuurhuis DH, Fu N, Ossendorp F, Melief CJ. Ins and outs of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006; **140**(1): 53-72.
9. Bachmann MF, Kopf M, Marsland BJ. Chemokines: more than just road signs. *Nat Rev Immunol.* 2006; **6**(2): 159-64.
10. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *NatRevImmunol.* 2002; **2**(3): 151-61.
11. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *AnnuRevImmunol.* 2002; **20**: 621-67.
12. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature.* 1997; **388**(6644): 782-7.
13. Rescigno M, Citterio S, Thery C, Rittig M, Medaglini D, Pozzi G, et al. Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *ProcNatlAcadSciUSA.* 1998; **95**(9): 5229-34.
14. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. 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. *JExpMed.* 1995; **182**(2): 389-400.
15. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* 1995; **375**(6527): 151-5.
16. Slepnev VI, De CP. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *NatRevNeurosci.* 2000; **1**(3): 161-72.

17. Valladeau J, Ravel O, Zutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*. 2000; **12**(1): 71-81.
18. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, et al. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *JExpMed*. 1999; **189**(2): 371-80.
19. Reis e S, Stahl PD, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *JExpMed*. 1993; **178**(2): 509-19.
20. Thery C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2001; **13**(1): 45-51.
21. Platt N, da Silva RP, Gordon S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol*. 1998; **8**(9): 365-72.
22. Smith TR, Tang X, Maricic I, Garcia Z, Fanchiang S, Kumar V. Dendritic cells use endocytic pathway for cross-priming class Ib MHC-restricted CD8αα+TCRαβ+ T cells with regulatory properties. *J Immunol*. 2009; **182**(11): 6959-68.
23. Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*. 2006; **440**(7085): 808-12.
24. Marsland BJ, Battig P, Bauer M, Ruedl C, Lassing U, Beerli RR, et al. CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity*. 2005; **22**(4): 493-505.
25. Roy M, Waldschmidt T, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells. *J Immunol*. 1993; **151**(5): 2497-510.
26. van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol*. 1997; **9**(3): 330-7.
27. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*. 1996; **184**(2): 747-52.
28. Schuurhuis DH, Laban S, Toes RE, Ricciardi-Castagnoli P, Kleijmeer MJ, van der Voort EI, et al. Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli. *J Exp Med*. 2000; **192**(1): 145-50.
29. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*. 1998; **393**(6684): 478-80.
30. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. 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*. 1995; **182**(2): 389-400.
31. Bohn E, Sing A, Zumbihl R, Bielfeldt C, Okamura H, Kurimoto M, et al. IL-18 (IFN-γ-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. *J Immunol*. 1998; **160**(1): 299-307.

32. Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol.* 1998; **10**(3): 259-64.
33. Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW. Interleukin-16. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; **29**(11): 1231-4.
34. Kamath AT, Henri S, Battye F, Tough DF, Shortman K. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood.* 2002; **100**(5): 1734-41.
35. Waskow C, Liu K, Darrasse-Jeze G, Guermonprez P, Ginhoux F, Merad M, et al. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol.* 2008; **9**(6): 676-83.
36. Darrasse-Jeze G, Deroubaix S, Mouquet H, Victora GD, Eisenreich T, Yao KH, et al. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 2009; **206**(9): 1853-62.
37. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *JExpMed.* 1996; **184**(5): 1953-62.
38. del Hoyo GM, Martin P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF, Ardavin C. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature.* 2002; **415**(6875): 1043-7.
39. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science.* 2009; **324**(5925): 392-7.
40. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *JExpMed.* 1992; **176**(6): 1693-702.
41. Scheicher C, Mehlig M, Zecher R, Reske K. Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *JImmunolMethods.* 1992; **154**(2): 253-64.
42. Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *JExpMed.* 1996; **184**(3): 903-11.
43. Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *ImmunolRev.* 1997; **156**: 25-37.
44. Saunders D, Lucas K, Ismaili J, Wu L, Maraskovsky E, Dunn A, et al. Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *JExpMed.* 1996; **184**(6): 2185-96.
45. Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood.* 2006; **108**(5): 1435-40.
46. Svensson M, Maroof A, Ato M, Kaye PM. Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity.* 2004; **21**(6): 805-16.

47. Tang H, Guo Z, Zhang M, Wang J, Chen G, Cao X. Endothelial stroma programs hematopoietic stem cells to differentiate into regulatory dendritic cells through IL-10. *Blood*. 2006; **108**(4): 1189-97.
48. Zhang M, Tang H, Guo Z, An H, Zhu X, Song W, et al. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. 2004; **5**(11): 1124-33.
49. Ardavin C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *NatRevImmunol*. 2003; **3**(7): 582-90.
50. Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*. 2001; **97**(11): 3333-41.
51. Wu L, D'Amico A, Hochrein H, O'Keeffe M, Shortman K, Lucas K. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood*. 2001; **98**(12): 3376-82.
52. Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, et al. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *JImmunol*. 2000; **165**(12): 6762-70.
53. Shortman K. Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions. *Immunol Cell Biol*. 2000; **78**(2): 161-5.
54. Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *JImmunol*. 2000; **164**(6): 2978-86.
55. Pulendran B, Lingappa J, Kennedy MK, Smith J, Teepe M, Rudensky A, et al. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *JImmunol*. 1997; **159**(5): 2222-31.
56. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De BP, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *JExpMed*. 1996; **184**(4): 1413-24.
57. Leenen PJ, Radosevic K, Voerman JS, Salomon B, van RN, Klatzmann D, et al. Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *JImmunol*. 1998; **160**(5): 2166-73.
58. Maldonado-Lopez R, De ST, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, et al. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *JExpMed*. 1999; **189**(3): 587-92.
59. Ohteki T, Fukao T, Suzue K, Maki C, Ito M, Nakamura M, et al. Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *JExpMed*. 1999; **189**(12): 1981-6.
60. Reis e S, Hieny S, Schariton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *JExpMed*. 1997; **186**(11): 1819-29.
61. Kronin V, Winkel K, Suss G, Kelso A, Heath W, Kirberg J, et al. A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *JImmunol*. 1996; **157**(9): 3819-27.

62. Suss G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *JExpMed*. 1996; **183**(4): 1789-96.
63. Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *ProcNatlAcadSciUSA*. 1999; **96**(3): 1036-41.
64. Pooley JL, Heath WR, Shortman K. 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. *JImmunol*. 2001; **166**(9): 5327-30.
65. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; **124**(4): 783-801.
66. Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2009; **227**(1): 221-33.
67. Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med*. 2007; **261**(6): 511-28.
68. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010; **327**(5963): 291-5.
69. Pasare C, Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity*. 2004; **21**(5): 733-41.
70. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2001; **2**(10): 947-50.
71. Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*. 2005; **438**(7066): 364-8.
72. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004; **5**(10): 987-95.
73. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*. 2003; **299**(5609): 1033-6.
74. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol*. 2006; **36**(4): 810-6.
75. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*. 2002; **298**(5601): 2199-202.
76. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011; **34**(5): 637-50.
77. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009; **27**: 519-50.
78. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011; **1813**(5): 878-88.
79. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; **3**(2): 133-46.
80. Premack BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med*. 1996; **2**(11): 1174-8.

81. McLoughlin RM, Witowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS, et al. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *J Clin Invest.* 2003; **112**(4): 598-607.
82. Hauss P, Selz F, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. Characteristics of antigen-independent and antigen-dependent interaction of dendritic cells with CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 1995; **25**(8): 2285-94.
83. Starling GC, McLellan AD, Egner W, Sorg RV, Fawcett J, Simmons DL, et al. Intercellular adhesion molecule-3 is the predominant co-stimulatory ligand for leukocyte function antigen-1 on human blood dendritic cells. *Eur J Immunol.* 1995; **25**(9): 2528-32.
84. Damle NK, Klussman K, Aruffo A. Intercellular adhesion molecule-2, a second counter-receptor for CD11a/CD18 (leukocyte function-associated antigen-1), provides a costimulatory signal for T-cell receptor-initiated activation of human T cells. *J Immunol.* 1992; **148**(3): 665-71.
85. Montoya MC, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F. Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev.* 2002; **186**: 68-82.
86. Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature.* 1989; **341**(6243): 619-24.
87. Lollo BA, Chan KW, Hanson EM, Moy VT, Brian AA. Direct evidence for two affinity states for lymphocyte function-associated antigen 1 on activated T cells. *J Biol Chem.* 1993; **268**(29): 21693-700.
88. Bour-Jordan H, Blueston JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol.* 2002; **22**(1): 1-7.
89. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005; **23**: 515-48.
90. Jin B, Sun T, Yu XH, Yang YX, Yeo AE. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clin Dev Immunol.* 2012; **2012**: 836485.
91. Buller RM, Holmes KL, Hugin A, Frederickson TN, Morse HC, 3rd. Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. *Nature.* 1987; **328**(6125): 77-9.
92. Andreasen SO, Christensen JE, Marker O, Thomsen AR. Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. *J Immunol.* 2000; **164**(7): 3689-97.
93. Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev.* 1996; **153**: 85-106.
94. Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol.* 2005; **23**: 23-68.
95. Tesselaar K, Xiao Y, Arens R, van Schijndel GM, Schuurhuis DH, Mebius RE, et al. Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2003; **170**(1): 33-40.
96. Vinay DS, Kwon BS. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol.* 1998; **10**(6): 481-9.
97. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature.* 1999; **397**(6716): 263-6.

98. Kosmaczewska A, Ciszak L, Bocko D, Frydecka I. Expression and functional significance of CTLA-4, a negative regulator of T cell activation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2001; **49**(1): 39-46.
99. Cox MA, Zajac AJ. Shaping successful and unsuccessful CD8 T cell responses following infection. *J Biomed Biotechnol*. 2010; **2010**: 159152.
100. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol*. 2003; **21**: 305-34.
101. Dubey C, Croft M, Swain SL. Naive and effector CD4 T cells differ in their requirements for T cell receptor versus costimulatory signals. *J Immunol*. 1996; **157**(8): 3280-9.
102. Cornelis GR. The Yersinia deadly kiss. *JBacteriol*. 1998; **180**(21): 5495-504.
103. Bockemuhl J, Roggentin P. [Intestinal yersiniosis. Clinical importance, epidemiology, diagnosis, and prevention]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2004; **47**(7): 685-91.
104. Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H. Molecular epidemiology of Yersinia enterocolitica infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006; **47**(3): 315-29.
105. Cover TL, Aber RC. Yersinia enterocolitica. *NEnglJMed*. 1989; **321**(1): 16-24.
106. Hanski C, Kutschka U, Schmoranzler HP, Naumann M, Stallmach A, Hahn H, et al. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of Yersinia enterocolitica serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *InfectImmun*. 1989; **57**(3): 673-8.
107. Devenish JA, Schiemann DA. HeLa cell infection by Yersinia enterocolitica: evidence for lack of intracellular multiplication and development of a new procedure for quantitative expression of infectivity. *InfectImmun*. 1981; **32**(1): 48-55.
108. Simonet M, Richard S, Berche P. Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of Yersinia pseudotuberculosis harboring the pYV plasmid. *InfectImmun*. 1990; **58**(3): 841-5.
109. Autenrieth IB, Firsching R. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by Yersinia enterocolitica: an ultrastructural and histological study. *JMedMicrobiol*. 1996; **44**(4): 285-94.
110. Man AL, Prieto-Garcia ME, Nicoletti C. Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys? *Immunology*. 2004; **113**(1): 15-22.
111. Revell PA, Miller VL. Yersinia virulence: more than a plasmid. *FEMS MicrobiolLett*. 2001; **205**(2): 159-64.
112. Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, et al. The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome. *MicrobiolMolBiolRev*. 1998; **62**(4): 1315-52.
113. Hu P, Elliott J, McCready P, Skowronski E, Garnes J, Kobayashi A, et al. Structural organization of virulence-associated plasmids of Yersinia pestis. *JBacteriol*. 1998; **180**(19): 5192-202.
114. Perry RD, Straley SC, Fetherston JD, Rose DJ, Gregor J, Blattner FR. DNA sequencing and analysis of the low-Ca²⁺-response plasmid pCD1 of Yersinia pestis KIM5. *InfectImmun*. 1998; **66**(10): 4611-23.

115. Snellings NJ, Popek M, Lindler LE. Complete DNA sequence of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:8 low-calcium-response plasmid reveals a new virulence plasmid-associated replicon. *InfectImmun.* 2001; **69**(7): 4627-38.
116. Bliska JB, Falkow S. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *ProcNatlAcadSciUSA.* 1992; **89**(8): 3561-5.
117. Miller VL, Falkow S. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *InfectImmun.* 1988; **56**(5): 1242-8.
118. Pierson DE, Falkow S. The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *InfectImmun.* 1993; **61**(5): 1846-52.
119. Arencibia I, Suarez NC, Wolf-Watz H, Sundqvist KG. *Yersinia* invasin, a bacterial beta1-integrin ligand, is a potent inducer of lymphocyte motility and migration to collagen type IV and fibronectin. *JImmunol.* 1997; **159**(4): 1853-9.
120. Brett SJ, Mazurov AV, Charles IG, Tite JP. The invasin protein of *Yersinia* spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins. *EurJImmunol.* 1993; **23**(7): 1608-14.
121. Ennis E, Isberg RR, Shimizu Y. Very late antigen 4-dependent adhesion and costimulation of resting human T cells by the bacterial beta 1 integrin ligand invasin. *JExpMed.* 1993; **177**(1): 207-12.
122. Isberg RR, Leong JM. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* 1990; **60**(5): 861-71.
123. Kampik D, Schulte R, Autenrieth IB. *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. *InfectImmun.* 2000; **68**(5): 2484-92.
124. Lundgren E, Carballeira N, Vazquez R, Dubinina E, Branden H, Persson H, et al. Invasin of *Yersinia pseudotuberculosis* activates human peripheral B cells. *InfectImmun.* 1996; **64**(3): 829-35.
125. Pepe JC, Miller VL. The biological role of invasin during a *Yersinia enterocolitica* infection. *InfectAgents Dis.* 1993; **2**(4): 236-41.
126. Schulte R, Grassl GA, Preger S, Fessele S, Jacobi CA, Schaller M, et al. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J.* 2000; **14**(11): 1471-84.
127. Schulte R, Zumbihl R, Kampik D, Fauconnier A, Autenrieth IB. Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. *MedMicrobiolImmunol(Berl).* 1998; **187**(1): 53-60.
128. Iriarte M, Vanooteghem JC, Delor I, Diaz R, Knutton S, Cornelis GR. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *MolMicrobiol.* 1993; **9**(3): 507-20.
129. Roggenkamp A, Bittner T, Leitritz L, Sing A, Heesemann J. Contribution of the Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O8. *InfectImmun.* 1997; **65**(11): 4705-10.
130. Delor I, Cornelis GR. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *InfectImmun.* 1992; **60**(10): 4269-77.

131. Ramamurthy T, Yoshino K, Huang X, Balakrish NG, Carniel E, Maruyama T, et al. The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. *MicrobPathog.* 1997; **23**(4): 189-200.
132. Robins-Browne RM, Still CS, Miliotis MD, Koornhof HJ. Mechanism of action of *Yersinia enterocolitica* enterotoxin. *InfectImmun.* 1979; **25**(2): 680-4.
133. Autenrieth IB, Bohn E, Ewald JH, Heesemann J. Deferoxamine B but not deferoxamine G1 inhibits cytokine production in murine bone marrow macrophages. *JInfectDis.* 1995; **172**(2): 490-6.
134. Autenrieth IB, Reissbrodt R, Saken E, Berner R, Vogel U, Rabsch W, et al. Desferrioxamine-promoted virulence of *Yersinia enterocolitica* in mice depends on both desferrioxamine type and mouse strain. *JInfectDis.* 1994; **169**(3): 562-7.
135. Haag H, Hantke K, Drechsel H, Stojiljkovic I, Jung G, Zahner H. Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *JGenMicrobiol.* 1993; **139**(9): 2159-65.
136. Aili M, Telepnev M, Hallberg B, Wolf-Watz H, Rosqvist R. In vitro GAP activity towards RhoA, Rac1 and Cdc42 is not a prerequisite for YopE induced HeLa cell cytotoxicity. *MicrobPathog.* 2003; **34**(6): 297-308.
137. Black DS, Bliska JB. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *MolMicrobiol.* 2000; **37**(3): 515-27.
138. Rosqvist R, Forsberg A, Wolf-Watz H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *InfectImmun.* 1991; **59**(12): 4562-9.
139. Von Pawel-Rammingen U, Telepnev MV, Schmidt G, Aktories K, Wolf-Watz H, Rosqvist R. GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *MolMicrobiol.* 2000; **36**(3): 737-48.
140. Black DS, Bliska JB. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J.* 1997; **16**(10): 2730-44.
141. Bliska JB, Black DS. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *InfectImmun.* 1995; **63**(2): 681-5.
142. Guan KL, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science.* 1990; **249**(4968): 553-6.
143. Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *InfectImmun.* 1996; **64**(3): 724-33.
144. Sauvonnnet N, Lambermont I, van der BP, Cornelis GR. YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *MolMicrobiol.* 2002; **45**(3): 805-15.

145. Yao T, Meccas J, Healy JI, Falkow S, Chien Y. Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *JExpMed.* 1999; **190**(9): 1343-50.
146. Barz C, Abahji TN, Trulzsch K, Heesemann J. The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett.* 2000; **482**(1-2): 139-43.
147. Galyov EE, Hakansson S, Wolf-Watz H. Characterization of the operon encoding the YpkA Ser/Thr protein kinase and the YopJ protein of *Yersinia pseudotuberculosis*. *JBacteriol.* 1994; **176**(15): 4543-8.
148. Juris SJ, Rudolph AE, Huddler D, Orth K, Dixon JE. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *ProcNatlAcadSciUSA.* 2000; **97**(17): 9431-6.
149. Leung KY, Straley SC. The yopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. *JBacteriol.* 1989; **171**(9): 4623-32.
150. Leung KY, Reisner BS, Straley SC. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *InfectImmun.* 1990; **58**(10): 3262-71.
151. McDonald C, Vaccratsis PO, Bliska JB, Dixon JE. The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *JBiolChem.* 2003; **278**(20): 18514-23.
152. Skrzypek E, Cowan C, Straley SC. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *MolMicrobiol.* 1998; **30**(5): 1051-65.
153. Boland A, Cornelis GR. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *InfectImmun.* 1998; **66**(5): 1878-84.
154. Denecker G, Declercq W, Geuijen CA, Boland A, Benabdillah R, van GM, et al. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *JBiolChem.* 2001; **276**(23): 19706-14.
155. Denecker G, Totemeyer S, Mota LJ, Troisfontaines P, Lambermont I, Youta C, et al. Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *InfectImmun.* 2002; **70**(7): 3510-20.
156. Orth K, Xu Z, Mudgett MB, Bao ZQ, Palmer LE, Bliska JB, et al. Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science.* 2000; **290**(5496): 1594-7.
157. Palmer LE, Hobbie S, Galan JE, Bliska JB. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *MolMicrobiol.* 1998; **27**(5): 953-65.
158. Ruckdeschel K, Mannel O, Richter K, Jacobi CA, Trulzsch K, Rouot B, et al. *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *JImmunol.* 2001; **166**(3): 1823-31.

159. Iriarte M, Cornelis GR. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *MolMicrobiol.* 1998; **29**(3): 915-29.
160. Persson C, Nordfelth R, Andersson K, Forsberg A, Wolf-Watz H, Fallman M. Localization of the *Yersinia* PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism. *MolMicrobiol.* 1999; **33**(4): 828-38.
161. Zumbihl R, Aepfelbacher M, Andor A, Jacobi CA, Ruckdeschel K, Rouot B, et al. The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *JBiolChem.* 1999; **274**(41): 29289-93.
162. China B, Sory MP, N'Guyen BT, De BM, Cornelis GR. Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *InfectImmun.* 1993; **61**(8): 3129-36.
163. Roggenkamp A, Ruckdeschel K, Leitritz L, Schmitt R, Heesemann J. Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *InfectImmun.* 1996; **64**(7): 2506-14.
164. Roggenkamp A, Neuberger HR, Flugel A, Schmoll T, Heesemann J. Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *MolMicrobiol.* 1995; **16**(6): 1207-19.
165. Schulze-Koops H, Burkhardt H, Heesemann J, Kirsch T, Swoboda B, Bull C, et al. Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *InfectImmun.* 1993; **61**(6): 2513-9.
166. Nakajima R, Motin VL, Brubaker RR. Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *InfectImmun.* 1995; **63**(8): 3021-9.
167. Sing A, Roggenkamp A, Geiger AM, Heesemann J. *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. *JImmunol.* 2002; **168**(3): 1315-21.
168. Welkos S, Friedlander A, McDowell D, Weeks J, Tobery S. V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. *MicrobPathog.* 1998; **24**(3): 185-96.
169. Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* 1999; **284**(5418): 1322-8.
170. Cornelis GR. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *NatRevMolCell Biol.* 2002; **3**(10): 742-52.
171. Cornelis GR. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol.* 2002; **158**(3): 401-8.
172. Koster M, Bitter W. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. 1997; **26**(4): 789-97.
173. Burghout P, van Boxtel R, Van Gelder P, Ringler P, Muller SA, Tommassen J, et al. Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol.* 2004; **186**(14): 4645-54.
174. Minamino T, Macnab RM. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *JBacteriol.* 1999; **181**(5): 1388-94.

175. Michiels T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert JM, Cornelis G. Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun*. 1990; **58**(9): 2840-9.
176. Sory MP, Cornelis GR. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol*. 1994; **14**(3): 583-94.
177. Anderson DM, Schneewind O. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica* Science. 1997; **278**(5340): 1140-3.
178. Yuan M, Deleuil F, Fallman M. Interaction between the *Yersinia* tyrosine phosphatase YopH and its macrophage substrate, Fyn-binding protein, Fyb. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2005; **9**(3-4): 214-23.
179. Fallman M, Deleuil F, McGee K. Resistance to phagocytosis by *Yersinia*. *Int J Med Microbiol*. 2002; **291**(6-7): 501-9.
180. Deleuil F, Mogemark L, Francis MS, Wolf-Watz H, Fallman M. Interaction between the *Yersinia* protein tyrosine phosphatase YopH and eukaryotic Cas/Fyb is an important virulence mechanism. *Cell Microbiol*. 2003; **5**(1): 53-64.
181. Aepfelbacher M, Heesemann J. Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by *Yersinia* outer proteins (Yops). *Int J Med Microbiol*. 2001; **291**(4): 269-76.
182. Aepfelbacher M, Zumbühl R, Heesemann J. Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by YopT of *Yersinia*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; **291**: 167-75.
183. Adkins I, Schulz S, Borgmann S, Autenrieth IB, Grobner S. 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*. 2008; **57**(Pt 2): 139-44.
184. Grutzkau A, Hanski C, Hahn H, Riecken EO. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut*. 1990; **31**(9): 1011-5.
185. Clark MA, Hirst BH, Jepson MA. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun*. 1998; **66**(3): 1237-43.
186. Schulte R, Kerneis S, Klinke S, Bartels H, Preger S, Kraehenbühl JP, et al. Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol*. 2000; **2**(2): 173-85.
187. Hamzaoui N, Kerneis S, Caliot E, Pringault E. Expression and distribution of beta1 integrins in in vitro-induced M cells: implications for *Yersinia* adhesion to Peyer's patch epithelium. *Cell Microbiol*. 2004; **6**(9): 817-28.
188. Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008; **52**(1): 2-12.
189. Autenrieth IB, Kempf V, Sprinz T, Preger S, Schnell A. Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines. *Infect Immun*. 1996; **64**(4): 1357-68.

190. Fallman M, Andersson K, Hakansson S, Magnusson KE, Stendahl O, Wolf-Watz H. *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *InfectImmun.* 1995; **63**(8): 3117-24.
191. Rosqvist R, Bolin I, Wolf-Watz H. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *InfectImmun.* 1988; **56**(8): 2139-43.
192. Visser LG, Annema A, van FR. Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. *InfectImmun.* 1995; **63**(7): 2570-5.
193. Autenrieth IB, Hantschmann P, Heymer B, Heesemann J. Immunohistological characterization of the cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes. *Immunobiology.* 1993; **187**(1-2): 1-16.
194. Autenrieth IB, Tingle A, Reske-Kunz A, Heesemann J. T lymphocytes mediate protection against *Yersinia enterocolitica* in mice: characterization of murine T-cell clones specific for *Y. enterocolitica* *InfectImmun.* 1992; **60**(3): 1140-9.
195. Bohn E, Autenrieth IB. IL-12 is essential for resistance against *Yersinia enterocolitica* by triggering IFN-gamma production in NK cells and CD4+ T cells. *JImmunol.* 1996; **156**(4): 1458-68.
196. Falgarone G, Blanchard HS, Riot B, Simonet M, Breban M. Cytotoxic T-cell-mediated response against *Yersinia pseudotuberculosis* in HLA-B27 transgenic rat. *InfectImmun.* 1999; **67**(8): 3773-9.
197. Falgarone G, Blanchard HS, Virecoulon F, Simonet M, Breban M. Coordinate involvement of invasin and Yop proteins in a *Yersinia pseudotuberculosis*-specific class I-restricted cytotoxic T cell-mediated response. *JImmunol.* 1999; **162**(5): 2875-83.
198. Noll A, Autenrieth IB. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* HSP60 immunostimulating complexes or *Yersinia* HSP60 plus interleukin-12. *InfectImmun.* 1996; **64**(8): 2955-61.
199. Bohn E, Schmitt E, Bielfeldt C, Noll A, Schulte R, Autenrieth IB. Ambiguous role of interleukin-12 in *Yersinia enterocolitica* infection in susceptible and resistant mouse strains. *InfectImmun.* 1998; **66**(5): 2213-20.
200. Autenrieth IB, Beer M, Bohn E, Kaufmann SH, Heesemann J. Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. *InfectImmun.* 1994; **62**(6): 2590-9.
201. Bohn E, Heesemann J, Ehlers S, Autenrieth IB. Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against *Yersinia enterocolitica*. *InfectImmun.* 1994; **62**(7): 3027-32.
202. Hein J, Kempf VA, Diebold J, Bucheler N, Preger S, Horak I, et al. Interferon consensus sequence binding protein confers resistance against *Yersinia enterocolitica*. *InfectImmun.* 2000; **68**(3): 1408-17.
203. Vogel U, Autenrieth IB, Berner R, Heesemann J. Role of plasmid-encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* in humoral immunity against secondary *Y. enterocolitica* infection in mice. *MicrobPathog.* 1993; **15**(1): 23-36.

204. Autenrieth SE, Autenrieth IB. *Yersinia enterocolitica*: subversion of adaptive immunity and implications for vaccine development. *Int J Med Microbiol.* 2008; **298**(1-2): 69-77.
205. Trulzsch K, Sporleder T, Leibiger R, Russmann H, Heesemann J. *Yersinia* as oral live carrier vaccine: influence of *Yersinia* outer proteins (Yops) on the T-cell response. *Int J Med Microbiol.* 2008; **298**(1-2): 59-67.
206. Autenrieth IB, Schmidt MA. Bacterial interplay at intestinal mucosal surfaces: implications for vaccine development. *Trends Microbiol.* 2000; **8**(10): 457-64.
207. Buhler OT, Wiedig CA, Schmid Y, Grassl GA, Bohn E, Autenrieth IB. The *Yersinia enterocolitica* invasin protein promotes major histocompatibility complex class I- and class II-restricted T-cell responses. *Infect Immun.* 2006; **74**(7): 4322-9.
208. Critchley-Thorne RJ, Stagg AJ, Vassaux G. Recombinant *Escherichia coli* expressing invasin targets the Peyer's patches: the basis for a bacterial formulation for oral vaccination. *Mol Ther.* 2006; **14**(2): 183-91.
209. Suzuki T, Yoshikawa Y, Ashida H, Iwai H, Toyotome T, Matsui H, et al. High vaccine efficacy against shigellosis of recombinant noninvasive *Shigella* mutant that expresses *Yersinia* invasin. *J Immunol.* 2006; **177**(7): 4709-17.
210. Trulzsch K, Geginat G, Sporleder T, Ruckdeschel K, Hoffmann R, Heesemann J, et al. *Yersinia* outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. *J Immunol.* 2005; **174**(7): 4244-51.
211. Sory MP, Hermand P, Vaerman JP, Cornelis GR. Oral immunization of mice with a live recombinant *Yersinia enterocolitica* O:9 strain that produces the cholera toxin B subunit. *Infect Immun.* 1990; **58**(8): 2420-8.
212. Sory MP, Kaniga K, Goldenberg S, Cornelis GR. Expression of the eukaryotic *Trypanosoma cruzi* CRA gene in *Yersinia enterocolitica* and induction of an immune response against CRA in mice. *Infect Immun.* 1992; **60**(9): 3830-6.
213. Lotter H, Russmann H, Heesemann J, Tannich E. Attenuated recombinant *Yersinia* as live oral vaccine carrier to protect against amoebiasis. *Int J Med Microbiol.* 2008; **298**(1-2): 79-86.
214. Gundel I, Weidinger G, ter Meulen V, Heesemann J, Russmann H, Niewiesk S. Oral immunization with recombinant *Yersinia enterocolitica* expressing a measles virus CD4 T cell epitope protects against measles virus-induced encephalitis. *J Gen Virol.* 2003; **84**(Pt 4): 775-9.
215. Welsch U. *Lehrbuch Histologie*. München: Elsevier GmbH; 2003.
216. Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway Immunobiology*. New York: Garland Science; 2008.
217. Stein JV, Nombela-Arrieta C. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology.* 2005; **116**(1): 1-12.
218. Aoshi T, Zinselmeyer BH, Konjufca V, Lynch JN, Zhang X, Koide Y, et al. Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8+ T cells. *Immunity.* 2008; **29**(3): 476-86.
219. Muraille E, Giannino R, Guirnalda P, Leiner I, Jung S, Pamer EG, et al. Distinct in vivo dendritic cell activation by live versus killed *Listeria monocytogenes*. *Eur J Immunol.* 2005; **35**(5): 1463-71.

220. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol.* 2005; **23**: 161-96.
221. Fu YX, Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol.* 1999; **17**: 399-433.
222. Randall TD, Carragher DM, Rangel-Moreno J. Development of secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol.* 2008; **26**: 627-50.
223. Muller G, Lipp M. Concerted action of the chemokine and lymphotoxin system in secondary lymphoid-organ development. *Curr Opin Immunol.* 2003; **15**(2): 217-24.
224. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science.* 1999; **286**(5447): 2098-102.
225. Reif K, Eklund EH, Ohl L, Nakano H, Lipp M, Forster R, et al. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature.* 2002; **416**(6876): 94-9.
226. Rodriguez N, Wantia N, Fend F, Durr S, Wagner H, Miethke T. Differential involvement of TLR2 and TLR4 in host survival during pulmonary infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Eur J Immunol.* 2006; **36**(5): 1145-55.
227. Talbot S, Totemeyer S, Yamamoto M, Akira S, Hughes K, Gray D, et al. Toll-like receptor 4 signalling through MyD88 is essential to control *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection, but not for the initiation of bacterial clearance. *Immunology.* 2009; **128**(4): 472-83.
228. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabet K, Kim SO, et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature.* 2003; **424**(6950): 743-8.
229. Autenrieth SE, Linzer TR, Hiller C, Keller B, Warnke P, Koberle M, et al. Immune evasion by *Yersinia enterocolitica*: differential targeting of dendritic cell subpopulations in vivo. *PLoS Pathog.* 2010; **6**(11): e1001212.
230. Autenrieth SE, Soldanova I, Rosemann R, Gunst D, Zahir N, Kracht M, et al. *Yersinia enterocolitica* YopP inhibits MAP kinase-mediated antigen uptake in dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2007; **9**(2): 425-37.
231. Erfurth SE, Grobner S, Kramer U, Gunst DS, Soldanova I, Schaller M, et al. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect Immun.* 2004; **72**(12): 7045-54.
232. Adkins I, Koberle M, Grobner S, Autenrieth SE, Bohn E, Borgmann S, et al. *Y. enterocolitica* inhibits antigen degradation in dendritic cells. *Microbes Infect.* 2008; **10**(7): 798-806.
233. Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J, Heesemann J. Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol.* 1998; **36**(9): 2557-64.
234. Corp AB. Fluorochrome Specification. In: Multicolour_Fluorochrome_Specs, editor. Piscataway: BD, Bioscience; 2011.
235. Invitrogen. Alexa Fluor Dye Series Note 1.1. 2011 [cited 2012 16. Feb]; Available from: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular->

[Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/The-Alexa-Fluor-Dye-Series.html](#)

236. Dianova. Immunologie : Fluoreszenz Topics. 2005.

237. Griffiths KL, O'Neill HC. Dendritic cells as immune regulators: the mouse model. J Cell Mol Med. 2008; **12**(5B): 1909-14.

238. Autenrieth SE, Warnke P, Wabnitz GH, Lucero Estrada C, Pasquevich KA, Drechsler D, et al. Depletion of Dendritic Cells Enhances Innate Anti-Bacterial Host Defense through Modulation of Phagocyte Homeostasis. PLoS Pathog. 2012; **8**(2): e1002552.

239. Koberle M, Klein-Gunther A, Schutz M, Fritz M, Berchtold S, Tolosa E, et al. *Yersinia enterocolitica* targets cells of the innate and adaptive immune system by injection of Yops in a mouse infection model. PLoS Pathog. 2009; **5**(8): e1000551.

240. Adkins I, Koberle M, Grobner S, Bohn E, Autenrieth IB, Borgmann S. *Yersinia* outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. Int J Med Microbiol. 2007; **297**(4): 235-44.

241. Grobner S, Autenrieth SE, Soldanova I, Gunst DS, Schaller M, Bohn E, et al. *Yersinia* YopP-induced apoptotic cell death in murine dendritic cells is partially independent from action of caspases and exhibits necrosis-like features. Apoptosis. 2006; **11**(11): 1959-68.

242. De Trez C, Pajak B, Brait M, Glaichenhaus N, Urbain J, Moser M, et al. 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. 2005; **175**(2): 839-46.

9 Veröffentlichung

Autenrieth SE, Linzer T-R, Hiller C, Keller B, Warnke P, et al. (2010) Immune Evasion by *Yersinia enterocolitica*: Differential Targeting of Dendritic Cell Subpopulations *In Vivo*. PLoS Pathog 6(11): e1001212. doi:10.1371/journal.ppat.1001212

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die auf verschiedene Weise die Entstehung und das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

- Ich danke Herrn Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und für seine Gutachtertätigkeit.
- Ich bedanke mich ganz besonders bei Frau Dr. Stella Autenrieth für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete und intensive wissenschaftliche Betreuung, die letztendlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.
- Meiner Arbeitsgruppe „DC“ danke ich für die schöne Zeit, so manche Kaffeepause, moralische Stütze und das tolle Arbeitsklima.
- Insbesondere danke ich Tanja Linzer, die viel Vorarbeit für diese Arbeit geleistet hat und immer bereit war mich zu unterstützen. Sie übernahm unter anderem einen Großteil der Mausinfektion und Milzentnahmen.
- Ich möchte mich bei Sandra Schmitz und Philipp Warnke bedanken, die mir ebenfalls viele Aufgaben im Labor abnahm.
- Für ihre Beratung bei Fluoreszenzfärbungen und ihr treffendes Urteil am Mikroskop möchte ich Dr. Monika Schütz danken.
- Ich danke Gudrun Haerer, die mich in der ersten Zeit einlernte und mir die Kniffe und Tricks der Histologie beibrachte.
- Auch allen anderen, hier nicht namentlich erwähnten InstitutsmitarbeiterInnen, danke ich herzlich.
- Schließlich danke ich meinen Freunden und meinem Freund Thomas Weisner, die stets ein offenes Ohr für mich hatten, bereitwillig für Ablenkung drum herum sorgten und beim Korrekturlesen dieser Arbeit halfen (ganz besonders Andreas Hässler).
- Ein besonderer Dank geht an meinen Eltern, Dr. Ruth und Dr. Eckhardt Hiller, für die große Unterstützung und das Vertrauen was sie in mich haben.

11 Lebenslauf

Clara Elise Hiller

Geboren am 10.12.1985 in Hamburg

Deutsche Staatsangehörigkeit, ledig

Facharztausbildung

Seit 06/2012 Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Medizinische Klinik II, Kardiologie, Angiologie, Intensivmedizin

Dissertation

2010 – 2012 Experimentelle Arbeit „Immunhistologische Analyse Dendritischer Zellen im Verlauf einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica in vivo*“, Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen, Prof. Dr. I. B. Autenrieth

2008 – 2010 Studentische Hilfskraft, Arbeitsgruppe Dendritische Zellen, Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen

Studium

10/2005 – 10/2011 Medizinstudium an der Eberhardt Karls Universität, Tübingen
Ärztliche Prüfung am 24.11.2011, Gesamtnote gut (2,5)

09/2009 – 05/2010 Auslandsstudium an der Universität La Laguna, Spanien

Schulbildung

07/2005 Schulzentrum Bördestraße, Bremen
Allgemeine Hochschulreife (Note 1,3)

2002/03 Amherst High School, Wisconsin, USA

Praktisches Jahr

Dermatologie Universitäts-Hautklinik Tübingen

Innere Medizin Medizinische Universitätsklinik Tübingen

Chirurgie Spital Rheinfelden, Lehrkrankenhaus Universität Basel, Schweiz

Famulaturen

Innere Medizin	Hospital Universitario de La Laguna, Spanien (02/2009)
Allgemeinmedizin	Centro de Salud de Taco, Spanien (08/2009)
Pädiatrie	Cebu Doctors Hospital, Philippinen (03/2009)
Gynäkologie	Hall in Tirol, Österreich (03/2008)

Qualifikationen

Sprachen:	Englisch (fließend), Spanisch (gute Kenntnisse)
EDV:	Microsoft Office, Microsoft Exel, EndNote
Medizin:	Notfall- und Akutmedizin, Sportmedizin, Anamnese und Gesprächsführung, Katastrophenmedizin, humanitäre Hilfe

Extracurriculäre Aktivitäten

Semestersprecherin (10/2005 – 10/2012)

Mitglied in der Fachschaft Medizin

AK: Segmed, Mentorenprogramm, Studiengebühren, Mit Sicherheit Verliebt