Tumorvakzinierung gegen den "Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2" (VEGFR2) mittels heterologem Antigentransport durch rekombinante Salmonellen



Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

> Vorgelegt von Stefan Jellbauer

München, Februar 2010

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt. München, Februar 2010

Stefan Jellbauer

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2006 bis Januar 2010 am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Holger Rüssmann erstellt.

Die Arbeit wurde betreut und von der biologischen Fakultät vertreten durch Prof. Dr. Angelika Böttger (Department Biologie II, Zell- und Entwicklungsbiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München).

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Jellbauer S, Panthel K, Köhn B, Hetrodt JH, Niethammer AG, Busch DH, Rüssmann H. *Tumor vaccination against Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2) using heterologous antigen delivery by recombinant Salmonella*. (Eingereicht)

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.02.2010 Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2010 Erster Gutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Anton Hartmann Sondergutachter: Prof. Dr. Holger Rüssmann

Meinen Eltern

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungen	V
1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Salmonellen	
2.1.1	Epidemiologie und Pathogenese	
2.1.2	Typ III Sekretionssystem (T3SS) von Salmonellen	7
2.1.3	S. typhimurium als Lebendimpfstoffträger	9
2.2	Krebs	13
2.2.1	Entstehung von Krebs	14
2.2.2	Operation, Chemotherapie und Bestrahlung als gängige Therapieformen	15
2.2.3	Immuntherapie als neuartige Behandlungsmethode	16
2.2.4	Kombinationstherapie	19
2.3	Angiogenese	20
2.3.1	Tumorangiogenese - Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen	20
2.3.2	"Vascular endothelial growth factor receptor 2" (VEGFR2)	24
2.3.3	Anti-Angiogenese als Therapiekonzept	26
2.3.4	Angiogenese und Metastasierung	28
2.4	Tumorvakzinierung gegen VEGFR2	29
2.5	Tumormodelle in der Maus	31
2.6	Ziel der Arbeit	32
3	Material und Methoden	35
3.1	Geräte	35
3.2	Verbrauchsmaterialien	36
3.3	Puffer und Lösungen	36
3.3.1	Chemikalien	36
3.3.2	Nährlösungen	38
3.3.3	Antibiotika	39
3.4	Bakterienstämme, Plasmide und eukaryontische Zelllinie	39
3.5	Antikörper	40
3.6	Tetramere	41

3.7	Molekularbiologische Methoden	42
3.7.1	Anzucht von Salmonellen	42
3.7.2	Molekulares Klonieren	42
3.7.3	PCR	42
3.7.4	Restriktionsverdau	43
3.7.5	Aufreinigung von DNA	44
3.7.6	Agarose-Gelelektrophorese	44
3.7.7	Konzentrationsbestimmung von DNA	44
3.7.8	Ligation	45
3.7.9	Herstellen elektrokompetenter Zellen	45
3.7.10	Transformation	45
3.7.11	Kontrolle der Klonierung	46
3.8	Arbeiten mit Proteinen	46
3.8.1	SDS-PAGE	46
3.8.2	Immunblot (Western Blot)	47
3.9	Zellkultur	48
3.9.1	Auftauen von Zellen	48
3.9.2	Zellkulturbedingungen und Passagieren der Zellen	48
3.9.3	Einfrieren von Zellen	49
3.10	Immunologische Methoden	49
3.10.1	Histologie und Immunhistochemie	49
3.10.1.	1 Einbettung der Organe	49
3.10.1.	2 Schneiden der eingebetteten Organe	49
3.10.1.	3 HE-Färbung	50
3.10.1.	4 Färbung des Bindegewebes	50
3.10.1.	5 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten	51
3.10.1.	6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie	51
3.10.2	Durchflusszytometrie (FACS)	51
3.10.2.	1 Lymphozytenanreicherung aus der Milz	51
3.10.2.	2 Lymphozytenanreicherung aus Tumoren	52
3.10.2.	3 Bestimmung der Gesamtzellzahl	52
3.10.2.	4 Immunfluoreszenzfärbung von Milzzellen	52
3.10.2.	5 FACS-Analyse	53

3.10.2	.6 Auswertung der FACS-Daten mit FlowJo Software	54
3.11	Mausversuche	54
3.11.1	Mausstamm	54
3.11.2	Haltung der Mäuse	55
3.11.3	Organentnahme	55
3.11.4	Orogastrische Infektion mit Salmonellen	55
3.11.5	Kolonisierungskinetik der Salmonelleninfektion	56
3.11.6	Kombinations-Immunisierung mit Salmonellen und CpG sowie Peptid	56
3.11.7	Flankentumormodell	57
3.11.8	Künstliches Lungenmetastasierungsmodell	57
3.12	Statistische Auswertung	57
4 E	rgebnisse	59
4.1	Klonierung einer Genfusion zur Synthese eines Salmonellen SPI-1-VEGE	R2
Hybric	lproteins	59
4.2	Synthese des Hybridproteins mittels T3SS der Salmonellen	61
4.3	Wachstumskurve der rekombinanten Salmonellen	63
4.4	Infektion von C57Bl/6J Mäusen mit SB824 (pHR584) und Kinetik der Besiedelt	ung
versch	iedener Organe	65
4.5	Kinetik der KDR2-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellantwort in der Maus nach ora	aler
Immur	nisierung	67
4.6	Qualität der KDR2-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellantwort	72
4.7	Effekt einer Kombinationsimmunisierung auf die KDR2-spezifische Immunantwort	75
4.8	Immunisierung gegen VEGFR2 reduziert Angiogenese	. 77
4.9	Immunisierung gegen VEGFR2 reduziert Tumorwachstum	80
4.10	Verminderung der Metastasierung durch Hemmung der Angiogenese	83
5 D	Diskussion	87
6 L	iteraturverzeichnis	110
7 A	nhang	124
7.1	DNA-Sequenzen	124
7.1.1	kdr2	124
7.1.2	Ausschnitt aus pHR584: YopE ₁₃₈ -kdr2	124
7.1.3	Murines <i>flk1</i> (VEGFR2)	124
8 D	Danksagung	126

IV

II. Abkürzungen

Abb.	Abbildungen
Ab	Antikörper (<i>antibody</i>)
AEC	Amino-Ethyl-Carbazol
Amp	Ampicillin
AP-1	Aktivator-Protein 1
APC	Antigen-präsentierende Zelle oder Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
aroA	Gen aro; 3-Phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Cell Culture
ATP	Adenosintriphosphat
В	"Bone marrow"
BALB/c	Bagg's Albino
bp	Basenpaare
BD	Becton Dickinson
BHI	"brain heart infusion"
BSA	Rinderserumalbumin
BrdU	Bromodeoxyuridine
B16F10	Mausmelanomzelllinie B16F10
Cam	Chloramphenicol
CD	"cluster of differentiation", Oberflächenmarker
Cdc42	"Cell division cycle 42"
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester
CMC	Zentrale Gedächtnis T-Zellen ("central memory T cells")
CpG	Cytosin Guanosin
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt ("cytotoxic T lymphocyt")
C-Terminus	Carboxyterminaler Teil eines Proteins
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dendritische Zelle
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DC	"dentritic cell"; Dendritische Zelle
DD	Dünndarm ("small intestine")
Dll4	"notch deltalike ligand 4"
DMEM	"Dulbecco`s modified Eagle medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DTT	Dithiothreit
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	"enhanced chemiluminescence"
EC	Effektor T-Zellen
ec	Extrazelluläre Domäne von VEGFR2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay"
EMA	Ethidiumbromid Monoazid
EMC	Effektor Gedächtnis T-Zellen ("effector memory T cells")
Erm	Erythromycin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	Farad
FACS	"fluorescent activated cell sorter", Durchflusszytometer
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	"Fibroblast growth factor"
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
Flk	"Fetal liver kinase"
GAP	"GTPase activating protein"
GEF	"guanine nucleotide exchange factor"
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde ("hour")
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bidest.}	zweifach destilliertes Wasser
H-2D ^b	Maus Haplotyp H-2D ^b
HBSS	"Hanks' balanced salt solution"
HE	Hämatoxylin Eosin
HIF	"Hypoxia inducible factor"
HLA-	
A*0201	Humaner Haplotyp HLA-A*0201
HRP	Meerrettich Peroxidase ("horseradish peroxidase")
IB	Immunblot
IFN	Interferon
lg	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	IL-2 Rezeptor
InvG	Protein InvG
i.p.	intraperitoneal

IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
i.v.	intravenös
KBE	Kolonie-bildende Einheit
kDa	Kilo-Dalton
Kdr	"Kinase insert domain-containing receptor"
LB	Luria-Bertani-Medium
LCMV	Lymphozytärer Choreomeningitisvirus
LD50	letale Dosis für 50 % der Individuen
LN	"lymph node", Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
mAb	monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
μg	Mikrogramm
ul	Mikroliter
mg	Milligramm
min	Minute
	Haupthistokompatibilitätskomplex ("major histocompatibility
MHC	complex")
ml	Milliliter
MLN	"mesenteric lymph node"; mesenteriale(r) Lymphknoten
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MOI	"multiplicity of infection"; Anzahl der Bakterien/Viren pro Wirtszelle
M/V	Masse pro Volumen
NCHS	"National Center for Health Statistics"
ng	Nanogramm
NIAID	"National Institute of Allergy and Infectious Diseases"
nm	Nanometer
Neo	Neomycin
NFAT	Nukleärer Faktor von aktivierten T-Zellen
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B
N-Terminus	Aminoterminaler Teil eines Proteins
OD_{600}	Optische Dichte bei Wellenlänge 600 nm
ORF	"Open reading frame"; offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBLC	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	Periphere Blutmonozyten
PBS	"phosphate buffered saline", Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cv7	Phycoerythrin-Cy7
PerCP	Perinidin Chlorophyll Protein

PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
РКС	Protein-Kinase C
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
РР	Peyer`sche Plaques
PrgI	Protein PrgI
PrgH	Protein PrgH
PrgK	Protein PrgK
Rac-1	"Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1"
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	"revolution per minute"; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RTKI	Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor
SA	Streptavidin
SCV	"Salmonella containing vacuole"
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SD	"standard deviation"; Standardabweichung
sek	Sekunde
SI	"Small intestine"; Dünndarm
SPI	"Salmonella pathogenicity island"
SptP	"Salmonella protein tyrosine phosphatase"
Т	Thymus
TAA	Tumor assoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
ТАР	"Transporter associated with antigen processing"
TCR	"T cell receptor"; T-Zell Rezeptor
T _h	T-Helferzelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TGN	trans-Golgi Netzwerk
TLR	"Toll-like" Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T3SS	Typ III Sekretionssystem
U	Unit
UV	Ultraviolettes Licht
V/V	Volumen pro Volumen
VEGF	"Vascular endothelial growth factor"

VEGFR2	"Vascular endothelial growth factor receptor 2"
WHO	"World health organisation"
WT	Wildtyp
W/V	Masse pro Volumen
W/W	Masse pro Masse
YopE	"Yersinia outer protein E"
α-	anti-
°C	Grad Celsius

Х

1 Zusammenfassung

Die Angiogenese ist ein entscheidender Mechanismus für das Fortschreiten von Tumorerkrankungen. Zahlreiche Studien zeigen, dass das Tumorwachstum unterdrückt werden kann, wenn die Tumorangiogenese, also die Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen, durch verschiedene Anti-Angiogenese Medikamente blockiert wird. Neuere Untersuchungen im Mausmodell haben ergeben, dass die Tumorangiogenese auch durch die Induktion einer zellulären Immunantwort gegen den "Vascular endothelial growth factor receptor 2" (VEGFR2) blockiert werden kann. VEGFR2 ist zusammen mit dem Ligand VEGF einer der Schlüsselfaktoren bei der Tumorangiogenese.

In dieser Arbeit wurde eine neuartige, in unserem Labor entwickelte Vakzinierungsstrategie verwendet, um VEGFR2-spezifische CD8⁺T-Zellen in Mäusen zu induzieren, die oral mit einem rekombinanten *Salmonella typhimurium* Stamm geimpft wurden. Die Induktion der zytotoxischen CD8⁺T-Zellen wurde durch das Einschleusen von H-2Db-spezifischen CD8⁺T-Zellepitopen (VILTNPISM = KDR2 and FSNSTNDILI = KDR3) des murinen VEGFR2 mittels Typ III Sekretionssystem (T3SS) von Salmonellen erreicht. Es wurden dazu kurze Proteinfragmente, die diese immundominanten Epitope enthalten, mit translozierten Typ III Effektorproteinen translational fusioniert und die Translokation dieser Hybridproteine in das Zytosol *in vitro* mit Hilfe von Western Blots nachgewiesen. *In vivo* wurde zunächst die Kolonisierungskinetik von Salmonellen, die eines der neu konstruierten Plasmide beinhalten (pHR584), in verschiedenen Organen der Maus charakterisiert.

Mäuse wurden oral mit rekombinanten Salmonellen immunisiert und die gegen Endothelzellen gerichteten zytotoxischen T-Zellen direkt durch KDR2- und KDR3-MHC I Tetramerfärbung nachgewiesen. Diese Methode wurde auch benutzt, um die Entstehung von KDR2-spezifischen Effektor-, "effector memory"- und "central memory"-T-Zellen durch zusätzliche Färbung mit CD62L und CD127 zu untersuchen. Die Effizienz der Salmonellen T3SS-vermittelten Vakzinierung gegen VEGFR2 wurde in Maustumormodellen getestet. Im Melanom-Flankentumormodell konnte eine signifikante Reduktion der Blutgefäßversorgung der Tumore (Angiogenese) und des Tumorwachstums durch diese Immunisierung gezeigt werden. Im künstlichen Metastasierungsmodell verringerte die Salmonellen-gesteuerte Vakzinierung die Metastasenbildung in der Lunge um 60%.

Zusammenfassung

Angiogenesis is a critical mechanism for tumor progression. Multiple studies have suggested that tumor growth can be suppressed if tumor angiogenesis is inhibited using various types of anti-angiogenic agents. Recent studies in mouse systems have shown that tumor angiogenesis can also be inhibited, if cellular immune responses are induced against vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), which is one of the key factors in tumor angiogenesis. In the proposed project, a novel vaccination strategy developed by our laboratory was applied to induce VEGFR2-specific CD8 T cells in mice orally vaccinated with a recombinant *Salmonella typhimurium* strain. Induction of cytotoxic T cells was achieved by cytosolic delivery of H-2Db-specific CD8 T-cell epitopes (VILTNPISM = KDR2 and FSNSTNDILI = KDR3) from the murine VEGFR2 using Salmonella's type III protein secretion system (T3SS). Short protein fragments containing these immunodominant epitopes were fused to translocate type III effector proteins. Translocation (cytosolic delivery) of these hybrid proteins into antigen-presenting cells was monitored by Western Blot analysis *in vitro. In vivo*, the colonization kinetics of salmonellae harbouring one of the newly constructed plasmids was characterized after oral immunization in different organs of the mouse.

In mice orally immunized with recombinant *Salmonella*, cytotoxic T cells targeting endothelial cells were directly monitored by KDR2- and KDR3- MHC class I tetramer staining. This technique was further used to characterize the development of KDR2- and KDR3-specific effector, effector memory and central memory CD8 T cells in lymphoid and non-lymphoid organs by co-staining with CD62L and CD127. Finally, the efficacy of *Salmonella* T3SS-based vaccination was evaluated to (i) protect mice from lethal challenges with melanoma cells in a prophylactic setting, and to (ii) reduce dissemination of spontaneous pulmonary metastases. In the melanoma flank tumor model it was shown that the vaccination reduced angiogenesis and tumor growth significantly. In the artificial lung metastasis model this *Salmonella*-directed vaccination resulted in a 60% reduction of the metastatic burden on murine lungs.

Das Thema der Tumorvakzinierung gegen VEGFR2 mittels heterologem Antigentransport durch rekombinante Salmonellen beinhaltet mehrere Teilbereiche der Biologie bzw. Medizin. Neben Onkologie und Immunologie spielt auch die medizinische Mikrobiologie eine große Rolle.

2.1 Salmonellen

2.1.1 Epidemiologie und Pathogenese

Salmonellen sind stabförmige, meist begeißelte Gram-negative Mikroorganismen, die zur Familie der Enterobakterien gehören. Der Name dieser fakultativ anaeroben Bakterien, die man vorwiegend im Darmlumen ihres Wirtsorganismus findet, geht auf ihren Entdecker Dr. Daniel Salmon zurück. Sie stellen die Hauptursache für Lebensmittelvergiftungen dar. Die Toxizität der Salmonellen ist hauptsächlich auf deren äußere Membran zurückzuführen, die größtenteils aus Lipopolysacchariden (LPS) besteht. Es gibt zwei Salmonellenspezies, *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica*.

Salmonella enterica Serovar Typhi (S. typhi) von Salmonella enterica Serovar Typhimurium (S. typhimurium) sind verantwortlich für systemische Infektionen und schwerwiegende Krankheiten wie etwa Typhus. Mit Hilfe der Methoden der Labormedizin lassen sich in der Einteilung nach dem Kauffmann-White-Schema mindestens 2400 verschiedene Typen (Serovare) unterscheiden (1). Die Serovare S. typhimurium und S. enteritidis von Salmonella enterica sind die Erreger der Gastroenteritis (Nahrungsmittelvergiftung). Diese Mikroorganismen verursachen durch bestimmte Proteine und Endotoxine (LPS) im Darm eine Störung der normalen Funktion in deren Folge es zu massiven Durchfallerkrankungen (Enteritis) kommt. Eine Gastroenteritis kann bei immunsupprimierten oder älteren Menschen im schlimmsten Falle tödlich verlaufen, weil durch die Endotoxine auch die Herzfunktion, der Kreislauf sowie die Temperaturregulation beeinflusst werden. Im Gegensatz zum humanpathogenen S. typhi Serovar, kann S. typhimurium eine Vielzahl von Säugetieren befallen. Im Mausmodell löst S. typhimurium eine Typhus-ähnliche, systemische Krankheit aus und dient daher als Modell für die Typhus-Erkrankung beim Mensch, die durch S. typhi hervorgerufen wird. Das Ziel dieses Mausmodells ist die Erforschung der detaillierten Immunantwort gegen systemische Salmonelleninfektionen, um Rückschlüsse auf eine

mögliche protektive Immunantwort gegen *S. typhi* ziehen zu können (2-4). Im Menschen verursacht *S. typhimurium* unter Umständen eine Sepsis, in Kälbern tödliche Durchfallerkrankungen (5). Die Infektion mit *S. typhimurium* in der Maus dient als Modell für Infektion mit *S. typhi* im Menschen.

Nach der oralen Aufnahme, beispielsweise durch Nahrungsmittelverunreinigungen, passiert *S. typhimurium* den Magen und infiziert bevorzugt das terminalen Ileum des Dünndarms (siehe Abb. 1). Dazu müssen die Bakterien das Darmlumen verlassen und die Epithelzellschicht durchqueren, um Gewebeschichten des Wirts zu erreichen. Die aktive Passage der intestinalen Mukosa und des Epitheliums erfolgt vor Allem über M-Zellen in den Peyer`schen Plaques (PPs) des Ileums (6). Eine weitere aktive Eintrittspforte für Salmonellen sind Enterozyten, die ebenfalls über Bakterien-vermittelte Endozytose invadiert werden (7). Als alternative Methode wurde kürzlich die passive Aufnahme durch dendritische Zellen (DCs) bekannt. Die DCs in der Lamina Propria, die unter dem Dünndarmepithel liegt, endozytieren über Ausstülpungen die im Ileum lokalisierten Salmonellen und transportieren sie durch die Epithelzellschicht (8).



Nature Reviews | Microbiology

Abb. 1 Systemische Typhusinfektion. Nach oraler Aufnahme gelangen die Salmonellen über den Magen-Darm-Trakt in das terminale Ileum des Dünndarm und verlassen das Darmlumen vor Allem durch M-Zellen. Die Bakterien breiten sich im Organismus aus und kolonisieren Lymphknoten (LN), Leber und Milz, was zu einer systemischen Salmonelleninfektion führt. Abbildung modifiziert aus (9).

Nach dem Durchqueren der Epithelzellschicht folgt die Infektion benachbarter Enterozyten, das Vordringen zu den Lymphfollikeln der PPs und die Invasion der Salmonellen in nichtphagozytische und phagozytische Wirtszellen (2;3). Nach dem Eindringen in die Zielzelle verbleiben Salmonellen intrazellulär in einem membrangebundenen Kompartiment, welches als Makropinosom bzw. "Salmonella containing vacuole (SCV) bezeichnet wird. Dadurch bleiben die Bakterien vom zytosolischen Kompartiment der Zelle isoliert, wodurch eine intrazelluläre Vermehrung und das Überleben der Bakterien ermöglicht wird. Diese Fähigkeit, innerhalb der SCV in eukaryontischen Zellen zu persistieren und zu replizieren stellt das Pathogenitätsprinzip von *S. typhimurium* dar (10). Durch diese aktive Invasion in die Wirtszellen gelangen die Salmonellen in die mesenterialen Lymphknoten (MLN), die Leber und die Milz (11). Die genauen Mechanismen und Transportwege, über die die Salmonellen zu den Organen gelangen, sind noch unklar. Es wäre möglich, dass die Bakterien innerhalb von DCs über die Lymphe von der Lamina Propria zu den MLN gelangen (5). Salmonellen können in eukaryontischen Mirtszellen überleben und sich dort vermehren. Dies führt schließlich zu einer systematischen Infektion im Wirtsorganismus (12).

Die für Pathogenitätsfaktoren oder Virulenzfaktoren kodierenden Gene von Salmonellen befinden sich auf großen genomischen DNA-Abschnitten. Mehrere dieser sog. "*Salmonella* Pathogenicity Islands" (SPI) tragen die genetische Information für bestimmte Faktoren, die für die Kolonisierung und Infektion der Wirtsorganismen verantwortlich sind (9). Von besonderer Bedeutung sind SPI-1 und SPI-2, weil sie zwei verschiedene Typ III Sekretionssysteme (T3SS, siehe 2.1.2) für den Transport von Effektormolekülen in die Wirtszelle kodieren. Diese Faktoren induzieren die Internalisierung der Bakterien. Auch andere Gram-negative Bakterien besitzen diese Proteinsekretionssysteme, die auf den Export von Virulenzfaktoren in das Zytoplasma der Wirtszellen spezialisiert sind.

Die Infektion mit Salmonellen läuft in zwei Phasen ab. *S. typhimurium* induziert seine eigene Aufnahme in phagozytierende und nicht-phagozytierende Zellen durch Effektorproteine, die über das T3SS der SPI-1 in die Wirtszelle geschleust werden und dort verschiedene Signaltransduktionswege manipulieren. In dieser Infektionsphase sind die Virulenzgene der SPI-1 aktiv (12). Sie werden über die Plasmamembran hinweg in das Zytosol der Wirtszelle transloziert und sind an der Invasion von Endothelzellen sowie der Modulation der Immunantwort beteiligt (9). Ein Beispiel für eine SPI-1 Effektorprotein ist SopE. Nach der Translokation über das T3SS induziert es im Zytosol der Wirtszelle die Aktivität von Guanidin-Austausch-Faktoren (GEF) und aktiviert die Wirtszell-GTPasen Cdc42 sowie Rac-1. Dadurch wird das sog. "Membrane-Ruffling" ausgelöst, welches das Umschlingen der

Salmonellen durch Aktinpolymerisierung bezeichnet. Außerdem werden Signalkaskaden aktiviert, die eine Entzündungsreaktion des Wirts unterstützen.



Abb. 2 Invasion von Salmonellen in Wirtszellen. Salmonellen-Effektorproteine, die über das T3SS in das Zytoplasma der Wirtszelle transloziert werden, induzieren das "Membrane Ruffling" und die Aufnahme der Bakterien mittels Makropinozytose. SopE induziert durch seine GEF-Aktivität und die Aktivierung von Cdc42 und Rac-1 das "Membrane ruffling". SptP hemmt diesen Vorgang durch GAP-Aktivität und Blockieren von Cdc42 und Rac-1.

Anschließend kommt es mittels Makropinozytose zur Aufnahme der Salmonellen, die daraufhin in der SCV persistieren. Das GTPase-aktivierende Protein (GAP) SptP wird zu einem späteren Zeitpunkt synthetisiert und inhibiert die weitere Samonellenaufnahme durch Blockierung des "Membran Rufflings".

Die zweite Phase der Samonelleninfektion erstreckt sich über mehrere Tage und beschreibt die intrazelluläre Persistenz und Replikation der Salmonellen. Dadurch lässt sich eine steigende Anzahl an Bakterien in der Leber und Milz feststellen (13). In dieser Zeit wird das T3SS auf der SPI-2 der Salmonellen aktiviert und transloziert andere Effektorproteine durch die Vakuolenmembran der SCV, die für Replikation und Überleben der Bakterien verantwortlich sind (12). Diese Effektoren sind unter Anderem für die Bildung von Salmonellen-induzierten Filamenten, die Aufrechterhaltung der SCV Membran, die perinukleäre Lokalisation der SCV und die Beeinflussung des Mikrotubuli- und Aktin-Netzwerks um die SCV verantwortlich (14;15).

In dieser Arbeit wurden die Salmonellenstämme SB824 und BRD620 verwendet. SB824 ist ein attenuierter *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*S. typhimurium*)-Stamm, der Mutationen in den Genen *aroA* und *sptP* aufweist (16). BRD620 (*S. dublin*) ist ein attenuierter *Salmonella enterica* Serovar Dublin-Stamm (17), der in den Genen *aroA* und *aroD* mutiert ist.

2.1.2 Typ III Sekretionssystem (T3SS) von Salmonellen

Typ III Sekretionssysteme (T3SS) spielen bei vielen pathogenen und symbiontischen Mikroorganismen eine wichtige Rolle als Translokationsapparat für bakterielle Effektorproteine. Sie stellen eine der wichtigsten Anpassungen von Bakterien an die Umgebung in eukaryontischen Wirtsorganismen dar. Kubori und Kollegen entdeckten 1998 die supramolekulare Struktur des T3SS von Salmonellen (18).

Gram-negative Bakterien besitzen verschiedene Systeme zur Proteinsekretion. Man unterscheidet Typen I-VI. Die Proteine werden durch diese Transportsysteme aktiv aus dem Zytoplasma des Bakteriums über die innere und äußere Membran in das umgebende Medium oder auf die Oberfläche der bakteriellen Zelle transportiert (4;19). Das bekannteste und am besten untersuchte Transportsystem bei Salmonellen ist das T3SS, das aus ca. 40 Proteinen aufgebaut ist. Das T3SS existiert auch bei anderen Gram-negativen Krankheitserregern des Menschen (Yersinien, Shigellen). Außerdem kommt es in enteropathogenen *E. coli* vor (20). Die Hauptfunktion des T3SS ist die Sekretion von sog. Effektorproteinen aus dem Zytosol der Bakterien und die darauffolgende Translokation in eukaryontische Wirtszellen.

Das T3SS besitzt eine charakteristische Nadelstruktur, die homologe Bestandteile zum Flagellensystem von Bakterien aufweist. Beispielsweise weist der zylinderförmige Basalkörper der Nadelstruktur des T3SS Ähnlichkeiten zum Basalkörper der Flagellen auf. Außerdem ähnelt der flagelläre Haken der sog. Nadel beim T3SS (20;21). Im Elektronenmikroskop sind die isolierten Nadelkomplexe gut zu sehen (Abb. 3A). Ein vereinfachter Aufbau des T3SS von Salmonellen ist in Abb. 3B dargestellt. Zwei Paare von Ringen, die von einem Stab zusammengehalten werden, bilden den Zylinder, der sich über die innere und äußere Membran der bakteriellen Zellwand erstreckt. Über dem Zylinder befindet sich die hauptsächlich aus der Untereinheit PrgI aufgebaute nadelförmige Struktur, die die Wirtszellmembran durchdringt. Das Protein PrgH ist ein wesentlicher Bestandteil der inneren Ringe. Die äußeren Ringe, die mit der Peptidoglykanschicht und der äußeren Membran in Kontakt sind, sind hauptsächlich aufgebaut aus InvG, einem Mitglied der Sekretin-

Proteinfamilie. Ein Bindeglied zwischen den Ringpaaren stellt das Protein PrgK dar (18). Als Energielieferant für das T3SS dient die an der inneren Membran lokalisierte ATPase InvC. Aufgrund des komplexen Aufbaus dieses Proteintranslokationsapparates spricht man auch von Mikroinjektion (14).



Abb. 3 Typ III Sekretionssystem (T3SS) von Salmonellen. A Elektronenmikroskopische Aufnahme von isolierten Nadelkomplexen. B Vereinfachter Aufbau des T3SS von Salmonellen (Nadelkomplex). Modifiziert aus (14).

In *S. typhimurium* werden zwei Typ III Sekretionssysteme, die an der Virulenz der Bakterien beteiligt sind, von getrennten genomischen Regionen, SPI-1 und SPI-2, kodiert. Durch Kontakt mit der eukaryontischen Wirtszelle wird das T3SS der SPI-1 aktiviert und bildet ein Proteinsekretionssystem aus, das auf den Export von Virulenzfaktoren direkt in das Zytosol der Wirtszelle spezialisiert ist (2). Durch diese nadelförmige Struktur werden Effektor- bzw. Virulenzproteine über die bakterielle und die Wirtszellmembran in das Wirtszytosol transloziert und induzieren die Aufnahme der Salmonellen mittels Makropinozytose. Innerhalb der Wirtszelle verbleiben Salmonellen in der SCV. Das T3SS der SPI-2 wird erst unter diesen intrazellulären Bedingungen aktiviert und dient dem intrazellulären Überleben und der Proliferation der Bakterien (22). Mit Hilfe dieser speziellen Sekretionssysteme translozieren Salmonellen verschiedene Effektorproteine in das Wirtszytoplasma. Dies geschieht entweder zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion von extrazellulären Orten und der SCV aus oder zu späteren Zeitpunkten der Invasion ebenfalls von der SCV aus, aber über ein anderes T3SS.

2.1.3 S. typhimurium als Lebendimpfstoffträger

Lebend replizierende, avirulente Stämme von Salmonella typhimurium werden häufig als Vehikel für heterologe Antigene benutzt, weil sie nach oraler Gabe komplexe mukosale und systemische Immunantworten auslösen (3). Salmonellen werden oral, meist über die Nahrung, aufgenommen und gelangen für gewöhnlich über mukosale Oberflächen im terminalen Ileum des Dünndarms in den Wirtsorganismus. Durch diese mukosale Infektion kommt es zu einer zellvermittelten Immunantwort durch CD4⁺- und CD8⁺T-Zellen. Für einen langlebigen Schutz vor Infektionen ist die Aktivierung einer mukosalen und systemischen Immunantwort essentiell. Salmonellen und andere attenuierte Mikroorganismen werden als orale um einen langlebigen Schutz vor Lebendvakzine verwendet, intrazellulären Krankheitserregern zu vermitteln (23). Im Laufe der Infektion mit Salmonellen werden in der Maus humorale und zelluläre Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems stimuliert. Zu Beginn werden die Salmonellen durch Phagozyten kontrolliert. Die Maus überlebt die bakterielle Infektion, weil Entzündungsmediatoren wie TNF-α, IL-6, IL-12 und IFN-γ Makrophagen und Granulozyten aktivieren (24). Das angeborene Immunsystem kann zwar die Ausbreitung und Proliferation der Salmonellen für einige Tage unterdrücken, aber für die Eliminierung der Mikroorganismen ist das adaptive Immunsystem nötig. Die Elemente dieses spezifischen Immunsystems sorgen für die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen und die Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺T-Zellantworten (25).

Für die Impfstoffentwicklung mit Salmonellen als Lebendvektoren wurden spezielle Salmonellen gentechnisch hergestellt, die in ihrer Pathogenität abgeschwächt sind, aber trotzdem eine ausreichende Immunantwort induzieren. Es wurden verschiedene attenuierte *S. typhimurium*-Mutanten konstruiert, die auch zur Expression von heterologen Antigenen genutzt wurden, um sie als Lebendvakzine gegen unterschiedliche Krankheitserreger einzusetzen (13). Die Attenuierung der Salmonellen erfolgt unter Anderem durch eine Mutation im *aroA* Gen, dessen Genprodukt für den Abbau aromatischer Aminosäuren verantwortlich ist. Dieser mutierte Stamm verbleibt nach oraler Infektion ungefähr vier Wochen in der Maus, bevor er durch Komponenten des Immunsystems eliminiert wird. Diese Zeit reicht aus, um komplexe Immunantworten zu induzieren, wodurch sich die *aroA*-Mutante sehr gut als Lebendvektor eignet. (26). Diese attenuierten Salmonellen wurden im Tiermodell verwendet, um heterologe Antigene z.B. aus *Listeria monocytogenes* oder auch *Yersinia pestis* zu exprimieren (27;28). Es gibt auch klinische Studien in Menschen, bei denen attenuierte

rekombinante Salmonellen beispielsweise als Lebendvektor gegen *Helicobacter pylori* zum Einsatz kamen, indem sie die *Helicobacter*-Urease heterolog exprimierten (29). Der abgeschwächte *S. typhi*-Impfstamm Ty21a ist ein zugelassener Impfstoff im Menschen gegen Typhus (30).

Salmonellen besitzen die Eigenschaft, sowohl phagozytierende als auch nichtphagozytierende Zellen zu invadieren (2;3). Wie bereits oben erwähnt verbleiben Salmonellen in der SCV, sind dadurch vom Zytosol isoliert und synthetisierte bakterielle Proteine werden über den MHC Klasse II-Weg prozessiert, der zu einer CD4⁺T-Zellantwort führt (Abb. 4). Um T-Zellen zu aktivieren, muss ein Antigen in der Regel von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen, prozessiert und mittels MHC-Oberflächenmolekülen naiven T-Zellen präsentiert werden. Man unterscheidet dabei den MHC Klasse I- vom MHC Klasse II-Antigenpräsentationsweg.

Der T-Zellrezeptor (TCR) erkennt ein Antigenpeptid, das von MHC-Molekülen auf der Oberfläche von APCs präsentiert wird. Die intrazellulären Wege der Prozessierung und Antigenpräsentation unterscheiden sich entsprechend der Herkunft der Antigenproteine. Zytosolische Antigene werden auf MHC Klasse I-Molekülen an CD8⁺T-Zellen präsentiert. Diese Klasse I-Moleküle bestehen aus einer Glykoprotein-Kette mit drei extrazellulären Domänen und einem Transmembran-Segment. ß2-Microglobulin ist nicht-kovalent als einzelne Domäne assoziiert. Die neu synthetisierte Glykoprotein-Kette wird zuerst in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert, wo sie durch Chaperone (z.B. Calnexin) stabilisiert wird bis das β2-Microglobulin an den Komplex binden kann. Dies führt zum Ablösen von Calnexin und zur Bindung der Chaperon-Proteine Calreticulin und Tapasin. Dieser gesamte Komplex wird als TAP ("transporter associated with antigen processing") Ladekomplex bezeichnet. Die zytosolischen Antigenproteine werden im Proteasom in Fragmente mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren zerlegt. Diese Peptide werden dann ins ER transportiert, binden an MHC I-Moleküle und stabilisieren dadurch den Komplex. Dies führt zum Ablösen von Calreticulin, Tapasin und TAP und das beladene MHC I-Molekül kann durch den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert werden (31;32).

Einleitung



Abb. 4 Antigenpräsentation durch *S. typhimurium*. A Salmonellenproteine werden in die SCV (Makropinosmom) sekretiert und über den MHC Klasse II – Antigenpräsentationsweg prozessiert und von CD4⁺T-Zellen erkannt. B Typ III-Hyridproteine werden über das T3SS ins Zytosol der Wirtszelle transloziert, auf dem MHC Klasse I–Antigenpräsentationsweg prozessiert und von CD8⁺T-Zellen erkannt.

Antigene, die auf MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden, stammen von Pathogenen, die sich in intrazellulären Vesikeln aufhalten oder von Proteinen oder Toxinen, die aus der extrazellulären Umgebung aufgenommen wurden. Sie werden CD4⁺T-Zellen präsentiert. Die antigenen Proteine werden in endolysosomalen Vesikeln durch Proteasen in kleine Peptidfragmente zerlegt. MHC Klasse II-Moleküle bestehen aus zwei nicht-kovalent verbundenen Glykoproteinen (α und β), die durch separate Gene kodiert werden. Die Herstellung der Moleküle erfolgt im ER. Eine zytosolische Signalsequenz sorgt für den Transport der MHC II-Moleküle über den Golgi-Apparat in das endolysosomale Kompartiment, wo das Antigen an das MHC II-Molekül binden kann (32;33).

Um einen effektiven Schutz gegen Viren, intrazelluläre Bakterien und Tumore zu erhalten ist eine CD8⁺T-Zellantwort essentiell (34-36). Rüssmann und Kollegen fanden eine Möglichkeit,

heterolog synthetisierte Proteine in Salmonellen, die eigentlich auf dem MHC II-Weg präsentiert werden, trotzdem für eine MHC Klasse I-Antigenpräsentation zugänglich zu machen, um eine CD8⁺T-Zellantwort zu induzieren. Sie nutzten das T3SS, um heterologe Proteine oder Antigene direkt in das Zytosol von APCs (z.B. Makrophagen und DCs) zu dirigieren (37). In einem ersten Versuch wurde ein MHC I-Epitop des Nukleoproteins vom lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV) durch molekulares Klonieren in das T3SS Effektormolekül "*Salmonella* protein tyrosine phosphatase" (SptP) integriert, ohne dessen Funktion zu stören (38). SptP fungierte als molekulares Trägermolekül, um dieses kleine virale Antigen in das Zytoplasma der Wirtszelle zu schleusen und eine MHC I-Immunantwort auszulösen. Diese neue Vakzinierungsstrategie schützte oral geimpfte Mäuse vor einer letalen Infektion mit dem Wildtypvirus.

In weiteren Untersuchungen wurde das immundominante p60-Epitop von *Listeria monocytogenes* an definierte N-terminale Translokationsdomänen des T3SS Effektorproteins "*Yersinia* outer protein E" (YopE) fusioniert. Die Translokation und der zytosolische Transport des chimären YopE-p60 Proteins in Makrophagen führte zu einer effizienten MHC Klasse I-Antigenpräsentation des p60-Nonamerpeptids $p60_{217-225}$ (39). Mäuse, die oral mit einer einzigen Dosis von attenuierten, YopE-p60 exprimierenden Salmonellen immunisiert wurden, zeigten im ELISPOT eine hohe Zahl an IFN- γ -produzierenden CD8⁺T-Zellen, die mit dem immundominanten p60 Peptid reagierten. Diese T-Lymphozyten vermittelten Schutz gegenüber einer Infektion mit dem intrazellulären Erreger *L. monocytogenes*.

Der Einsatz des T3SS von Salmonellen für die Induktion von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen ist auch eine attraktive Strategie, um Impfstoffe für die Immuntherapie von Tumoren zu entwickeln. Es wurde vielfach gezeigt, dass CD8⁺T-Zellen zur Eliminierung von soliden Tumoren beitragen (40-43). In zahlreichen experimentellen Tumormodellen wurden Tumorzelllinien verwendet, die mit Modelantigenen wie beispielsweise Ovalbumin (44) oder immunogenen viralen Bestandteilen (45;46) transfiziert waren.

Panthel und Kollegen transfizierten die Fibrosarcom-Zelllinie WEHI 164 mit einer DNA-Sequenz, die das CD8-Epitop $p60_{217-225}$ aus *Listeria* kodiert (47). Sie immunisierten BALB/c Mäuse orogastrisch mit rekombinanten Salmonellen, die ein chimäres p60 Protein direkt ins Zytosol von APCs translozieren. Die $p60_{217-225}$ -exprimierenden WEHI Tumorzellen wurden den Mäusen subkutan appliziert und es zeigte sich, dass 80% dieser Mäuse kein Tumorwachstum entwickelten. In weiteren Experimenten wurden $p60_{217-225}$ -spezifische CD8⁺T-Zell-Subpopulationen analysiert, die nach der Immunisierung mit Salmonellen und der

Tumorapplikation induziert wurden. Die Färbung mit CD62L (L-Selektin) und CD127 ("alpha-chain of interleukin 7-receptor") ergab, dass p60-spezifische "central memory" (CMC) und effector memory" (EMC) CD8⁺T-Zellen in der Milz und p60-spezifische Effektor (EC) sowie "effector memory" CD8⁺T-Zellen im Blut vorherrschten. Durch diese Versuche konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein bakterielles T3SS für heterologen Antigentransport genutzt werden kann, um zytotoxische Effektor und "memory" CD8⁺T-Zellantworten zu erzeugen, die einen effizienten Schutz vor Tumorwachstum gewähren.

2.2 Krebs

Laut einer Statistik der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sterben weltweit jährlich sieben Millionen Menschen an Krebs. Im Jahr 2005 war bei 13% aller Sterbefälle die Todesursache Krebs. Die häufigsten Krebsarten bei Männern sind Lungen- Bronchial-, Prostata- und Kolorektalkarzinom und bei Frauen das Lungen-, Bronchial-, Brust- und Kolorektalkarzinom (48). Krebs ist nach Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache. In Deutschland war nach Angaben des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) im Jahr 2007 für ca. 26% der Sterbefälle eine Krebserkrankung verantwortlich. Die aktuellen Medikamente wie beispielsweise Zytostatika können die Lebensdauer der Patienten erhöhen, indem sie das Fortschreiten der Krebserkrankung vermindern. Falls sich in der Krebsforschung und Krebsprävention in den nächsten Jahren keine ähnlich durchschlagenden Erfolge einstellen wie bei den Krankheiten des Kreislaufsystems, wird Krebs in 15 bis 20 Jahren zur Todesursache Nummer Eins in Deutschland werden (http://www.dkfz-heidelberg.de/de/krebsatlas).

In Abb. 5 sind die häufigsten Krebserkrankungen im Jahr 2007 aufgeführt. Bei Männern sind Lungen-, Dick- Enddarm, sowie Prostatakrebs am meisten verbreitet, während bei Frauen Brust, Lungen- und Dick- und Enddarmkrebs vorherrschen.



Abb. 5 Häufigste Krebserkrankungen in Deutschland im Jahr 2007 aufgeteilt nach Geschlecht. Daten wurden vom DKFZ Heidelberg erhoben.

2.2.1 Entstehung von Krebs

Die Entstehung von Krebs geht auf dynamische Veränderungen im Genom zurück. Dort etablieren sich Mutationen einerseits in Onkogenen, die mit einem Funktionsgewinn ("gain of function") verbunden sind und andererseits in Tumorsuppressorgenen, wo sie einen Funktionsverlust ("loss of function") hervorrufen (49). Beispiele hierfür sind das *ras*-Onkogen und das Tumorsuppressorgen *p53*. Mehrere solche genetischen Veränderungen lassen normale Zellen zu malignen Tumorzellen werden.

Durch Beobachtungen und Studien an menschlichen Tumoren und Tiermodellen ist man zu dem Schluss gekommen, dass die Transformation von normalen Zellen zu Krebszellen dem Darwin'schen Prinzip der Evolution entspricht. Die oben genannten genetischen Veränderungen verschaffen den Zellen einen Evolutionsvorteil, weil sie schneller und ungehindert wachsen können. Die genetische Instabilität zeigt sich am häufigsten durch Mutationen in DNA-Reparatursystemen von Krebszellen. Zusammenfassend betreffen diese Mutationen Gene, die für Zellteilung, Wachstum, Differenzierung, Altern und den programmierten Zelltod (Apoptose) verantwortlich sind (50).

Im Jahr 2000 präsentierten Hanahan und Weinberg die sechs Charakteristika des Tumorwachstums. Sie stellten die Hypothese auf, dass alle oder zumindest die meisten Tumore während ihrer Entwicklung die folgenden Eigenschaften erworben haben müssen (49):

- Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Faktoren
- Gewebeinvasion und Metastasierung
- Unbegrenztes Fortpflanzungspotential
- Fortwährende Angiogenese
- Unempfindlichkeit gegenüber pro-apoptotischen Faktoren
- Unabhängigkeit von exogenen Wachstumsfaktoren

Colotta und Kollegen schlugen als weitere Eigenschaft den Zustand der Entzündung vor (51;52). All diese Eigenschaften sind typisch für Tumorzellen. Allerdings ist es wichtig zu erwähnen, dass Tumore keineswegs homogene Gewebe sind, sondern sich sehr heterogen in ihrer Zellzusammensetzung darstellen.

2.2.2 Operation, Chemotherapie und Bestrahlung als gängige Therapieformen

Gegenwärtig werden Krebserkrankungen hauptsächlich durch Operation (chirurgische Entfernung), Chemotherapie und Bestrahlung therapiert. Dies sind traditionelle Methoden bei der Bekämpfung von Krebs.

Die Strahlentherapie wurde im 18. Jahrhundert von Marie Curie entdeckt, die Chemotherapie hat sich aus der Behandlung mit Senfgas entwickelt (53) und die operative Methode geht bereits zurück auf die alten Ägypter. Seit ungefähr 60 Jahren werden in der Chemotherapie hauptsächlich Zytostatika eingesetzt. Dies sind Medikamente, die die Zellteilung von Krebszellen hemmen. Als Chemotherapie wird heutzutage fast nur noch die Verkleinerung oder Zerstörung von Tumoren mit Zytostatika bezeichnet. Die molekularen Angriffspunkte dieser Medikamente sind die DNA und wichtige Faktoren der Zellteilung, welche ungünstigerweise nicht nur bei Krebszellen vorkommen sondern auch bei gesunden, nicht malignen Zellen. Deshalb kommt es zu den üblichen Nebenwirkungen wie einer vorübergehenden Schädigungen der Blutzellbildung oder auch Haarausfall. Beispiele für Chemotherapeutika sind Alkylanzien wie Cyclophosphamid oder Topo-Isomerase-Hemmstoffe wie Camptothecin. Durch diese Zytostatika werden Krebszellen massiv in ihrer Funktion gestört, weil die Zellteilung gestoppt und die so geschädigten Zellen vom Körper

eliminiert werden. Einige der Wirkstoffe werden anstelle der natürlich vorkommenden Nukleotide bei der Zellteilung eingebaut, andere blockieren wichtige Moleküle der Proteinbiosynthese. Diese Strategie ist ausgelegt auf die Eigenschaft von Tumorzellen, sich sehr schnell zu teilen. Allerdings gibt es auch gesunde Zellverbände, die eine ähnliche hohe Teilungsrate aufweisen wie beispielsweise Schleimhautzellen, Haarwurzelzellen und Blutzellen. Diese sind ebenfalls von der Wirkung der Zytostatika betroffen und es kommt zu oben genannten Nebenwirkungen (54-56). Die Chemotherapie erfolgt meist nur über kurze Zeiträume und unter Einsatz hoher Dosen an Medikamenten mit dem Ziel, viele Zellen zu zerstören. Die Phasen zwischen den Chemotherapien sind nötig, damit sich das gesunde Gewebe von der harschen Therapie erholt.

Bestrahlung und Operation von Tumoren sind häufiger angewendete Therapien als die Verabreichung von Zytostatika. Etwa die Hälfte aller Tumorpatienten erhält eine Strahlentherapie. Diese ionisierenden Strahlen haben eine zytotoxische und wachstumshemmende Wirkung auf proliferierende Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass der Erfolg der Strahlentherapie sowohl von der Art des Tumors, von der Apoptoserate der jeweiligen Tumorzellen, als auch von der durch die Bestrahlung induzierten Apoptose von Endothelzellen abhängt, weil dadurch die Gefäßversorgung beeinträchtigt wird. (57).

Die auf den ersten Blick einfachste Therapiemethode gegen den Krebs ist die chirurgische Entfernung eines Krebsgeschwürs. Dies ist aber nur möglich, wenn der Tumor gut zugänglich ist und dessen Entfernung keine lebenswichtigen Funktionen außer Kraft setzen würde. Wichtig für die Art der Therapie ist in diesem Zusammenhang, ob der Tumor bereits Metastasen gebildet hat, die sich in anderen Körperregionen festsetzen und solide Tumoren bilden können, und, ob sämtliche Krebszellen erfolgreich chirurgisch entfernt wurden (55). Ein Beispiel für eine metastasierende Tumorerkrankung ist das maligne Melanom. Chemotherapie und andere etablierte Maßnahmen sind in diesem Fall nur beschränkt einsetzbar und nicht nur aufgrund dieses Beispiels ist der Bedarf an neuen Therapieansätzen in der Krebsbekämpfung dringend notwendig.

2.2.3 Immuntherapie als neuartige Behandlungsmethode

Immuntherapie-Maßnahmen unterscheiden sich entscheidend von Chemotherapie und Bestrahlung, weil in diesen Fällen oft hohe Dosen über einen langen Zeitraum verabreicht werden müssen (58). Durch Chemotherapie, Bestrahlung und auch durch operative Entfernung

können starke Nebenwirkungen hervorgerufen werden, weil durch diese Behandlungsmethoden auch gesundes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen wird. Als neuartige Behandlungsmethode gegen Krebs gilt die Immuntherapie. In der aktuellen Krebstherapie wird die Immuntherapie bereits angewendet.

Die Zielmoleküle in der Tumorimmuntherapie sind Antigene, die von Krebszellen exprimiert werden. Diese Tumorzellen sollen durch Aktivierung der angeborenen oder erworbenen immunologischen Abwehr angegriffen und abgetötet werden (59). Die Immuntherapie umfasst verschiedene Einzelstrategien. Die am meisten genutzte Art der Immuntherapie ist die passive Form der Verabreichung von monoklonalen Antikörpern. Beispiele hierfür sind die Medikamente Avastin, Herceptin, Erbitux oder Rituxan. Diese Antikörper binden hochspezifisch an bestimmte Antigene oder Rezeptoren auf Krebszellen oder sind gegen Tumor-spezifische Enzyme oder Proteine gerichtet. Sie lösen z.B. Apoptose aus, aktivieren eine Antikörper-vermittelte Zytotoxizität oder blockieren Wachstumsfaktoren (60;61). Die passive Immuntherapie beschreibt den Transfer von T-Zellen oder Proteinen (Antikörpern), während der Begriff der aktiven Immuntherapie die eigentliche Impfung gegen Krebs bzw. Krebszellen bezeichnet.

Bei der aktiven Immuntherapie wird versucht, basierend auf dem Grundprinzip der Impfstrategie, eine spezifische und lang anhaltende Immunantwort gegen Tumorantigene auf Krebszellen zu induzieren. Während die passive Immuntherapie durch die Anwendung von Antikörpern bereits ein etabliertes Verfahren darstellt, werden große Anstrengungen unternommen, um neue Zielantigene auf Krebszellen zu finden. Im Vakzinierungskonzept, das auf T-Zellen basiert, wird versucht, Tumor-reaktive T-Zellen zu generieren und zu aktivieren, um eine Regression des Tumors zu erreichen. Die T-Zellen werden momentan entweder über einen adoptiven Transfer oder über einen T-Zellrezeptor Transfer verabreicht bzw. induziert (62).

Krebsimpfstoffe gehören zur aktiven Form der Immuntherapie, weil sie aktiv eine Immunantwort des Patienten stimulieren sollen. Ein Krebsimpfstoff kann Krebszellen, Zellbestandteile oder aufgereinigte Tumor-spezifische Antigene enthalten und soll die gerichtete Immunantwort gegen Krebszellen verstärken, die bereits im Patienten vorhanden ist, aber nicht ausreicht, um den Tumor zu beseitigen. Der Impfstoff kann mit Adjuvantien kombiniert werden, um das Immunsystem zusätzlich zu stimulieren.

Krebsimpfstoffe werden eingeteilt in Zell-basierte Vakzine, bei denen Tumorzellen des Patienten mit dessen Immunzellen *ex vivo* kultiviert und dann wieder appliziert werden und in

Vektor-basierte Vakzine, bei denen ein Vektor (z.B. Virus) benutzt wird, um Tumorspezifische Proteine oder andere Moleküle in den Patienten zu transferieren und dessen Immunsystem zu aktivieren.

Ein möglicher Vektor für Vakzine sind attenuierte Salmonellen. Sie können beispielsweise ein Plasmid tragen, das zur DNA-Vakzinierung verwendet wird (63). Bei dieser Immunisierungsstrategie wird DNA in den Wirtsorganismus transferiert, das kodierte Peptid oder Protein wird endogen synthetisiert und es kommt sowohl zur Induktion einer humoralen als auch einer zellulären Immunantwort. Meist besitzt dieser DNA-Impfstoff auch sogenannte CpG-Motive, die zusätzlich die angeborene Immunantwort mittels "Toll-like" Rezeptoren (TLRs) stimulieren. Bei der DNA-Vakzinierung können die Vorteile von inaktivierten Vakzinen (biologische Sicherheit) mit denen der Lebendimpfstoffe (stärkere Immunantwort) verbunden werden (64-66).

Die Immuntherapie wird meist in Kombination mit den bisher etablierten Methoden verwendet. Ein großer Vorteil der Immuntherapie sind die geringen Nebenwirkungen im Vergleich zur chirurgischer Entfernung, Chemotherapie und Bestrahlung. Zusätzlich bietet die Immuntherapie einen völlig neuen Ansatzpunkt im Kampf gegen Krebs gegenüber den herkömmlichen Therapiestrategien.

Impfungen sind eine sehr effektive Strategie zur Prävention von Infektionskrankheiten, aber sie sind weniger effektiv in einem therapeutischen Ansatz bei der Krebsbehandlung, wie sich in klinischen Studien herausgestellt hat (61). Dies könnte mit der geringen immunogenen Aktivität von Tumorantigenen, sowie mit der eingeschränkten Immunkompetenz von Krebspatienten zusammenhängen (61). Außerdem besitzen Krebszellen spezifische Eigenschaften wie Immuntoleranz, hohe Mutationsraten (67), verminderte MHC-Expression, Antigenmodulation, Fehlen kostimulatorischer Moleküle und Sekretion immunsuppressiver Moleküle, die eine effektive Immunantwort verhindern könnten (59).

Eine mögliche Alternative, um die Immunevasionsfähigkeit der Tumorzellen zu umgehen, besteht darin, Endothelzellen, die für die Blutversorgung der Tumoren zuständig sind, als Zielstruktur einer Therapie in Betracht zu ziehen. Diese Strategie wurde über gentherapeutische Ansätze, aktive Immunisierungen und verschiedene Angiogenese-Inhibitoren in die Tat umgesetzt und untersucht (siehe 2.3.3).
2.2.4 Kombinationstherapie

In einem neuen Konzept wird derzeit versucht, verschiedene Strategien in der Krebstherapie zu kombinieren. Eine Möglichkeit ist die Kombination aus Immuntherapie, Chemotherapie und Verabreichung von monoklonalen Antikörpern. Der Grund für diesen neuen Ansatz ist, dass weder zytotoxische Anti-Tumor-Medikamente noch hochspezifische Immuntherapien alleine Krebserkrankungen besiegen können. Gerade bei metastasierenden Tumoren sind Operationen und Bestrahlung keine sinnvollen Methoden (68). Aufgrund hoher Resistenzraten metastasierter Melanome gegenüber zahlreichen Chemotherapeutika werden Chemotherapie und Immunotherapie bei dieser Krebsart gewöhnlich in Kombination angewendet. Diese Strategie wurde bereits in zahlreichen Studien getestet. Beispielsweise wurde gezeigt, dass eine Chemotherapie die Wirksamkeit von Vakzinen gegen Tumorzellen erhöht und die Aktivität von adoptiv transferierten Tumor-spezifischen T-Zellen verstärkt (68).

Es gibt verschiedene Erklärungsversuche für die Tatsache, dass Chemotherapeutika die Wirksamkeit der Immuntherapie fördern. Zytostatika fördern den Tod der Krebszellen und verstärken damit die Kreuzpräsentation von Tumorantigenen *in vivo*. Die temporäre oder dauerhafte Schädigung des Knochenmarks (Myelosuppression), die zu einer verminderten Bildung von Blutzellen führt und durch die Chemotherapie hervorgerufen wird, könnte die Produktion von Zytokinen anregen, die Immunsuppressionsmechanismen unterdrücken und die normale Zellteilung fördern. Außerdem gibt es Hinweise auf einen Synergie-Effekt zwischen monoklonalen Antikörpern und Chemotherapie oder Peptid-Vakzinierung aufgrund der Induktion der endogenen humoralen und zellulären Immunantwort (69).

Durch die Kombination von verschiedenen Therapieformen sollen mehrere Signalwege gleichzeitig angesprochen werden. Ein Beispiel hierfür ist die Kombination von antiangiogenen Faktoren und zytotoxischen Medikamenten oder Bestrahlung, wodurch sich ein gesteigerter Anti-Tumor-Effekt zeigt. Bis jetzt ist der Mechanismus dieses Synergie-Effektes noch weitgehend unklar. Auf den ersten Blick ist es wenig verständlich, auf welche Weise die Reduktion der Blutversorgung eine Behandlung mit Chemotherapeutika fördern soll. Zur möglichen Erklärung dieses Phänomens wurde der Begriff der "metronomen Therapie" geprägt (70;71), welcher kurz aufeinander folgende Chemotherapien mit geringen Dosen bezeichnet. Dadurch werden bevorzugt sich teilende Endothelzellen in Blutgefäßen von Tumoren beschädigt. Durch die gleichzeitige Blockade des wichtigsten

Vaskularisierungsfaktors VEGF-A wird ein wesentliches Überlebenssignal für Endothelzellen ausgeschaltet und folglich der Effekt der Chemotherapie verstärkt.

2.3 Angiogenese

Die Angiogenese bezeichnet die Entwicklung und das Wachstum von kapillaren Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen (72;73). Die Angiogenese ist ein fundamentaler physiologischer Prozess sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus. Sie ist ebenfalls ein sehr wichtiger Vorgang bei der Tumorentstehung. Daneben spielt sie auch im normalen Gewebe in bestimmten Phasen der Entwicklung und im Wachstum eines Organismus eine Rolle. Beispielsweise muss ein Fötus im Mutterleib während der Embryogenese ein riesiges Netzwerk an Arterien, Venen und Kapillaren entwickeln, das später im menschlichen Körper vorhanden ist. Durch die Bildung von neuen Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen ("Vaskulogenese") wird ein grundlegendes Netzwerk an vaskulären Endothelzellen gebildet, die sich dann zu den eigentlichen Blutgefäßen entwickeln. Später wird dieses Netzwerk durch Angiogenese verändert und es bilden sich neue kleine Blutgefäße oder Kapillaren, die das embryonale Gefäßsystem vervollständigen. Bei Erwachsenen kommt Angiogenese nicht sehr häufig vor. Bei der Menstruation werden durch die Angiogenese im Uterus neue Blutgefäße gebildet und bei der Wundheilung ist Angiogenese für die Reparatur oder Regeneration von verletztem oder beschädigtem Gewebe wichtig (74-76). Für den Prozess der Angiogenese ist ein koordiniertes Zusammenspiel von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen in Endothelzellen und muralen Zellen (glatte Muskelzellen und Fibroblasten) notwendig.

2.3.1 Tumorangiogenese - Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen

Angiogenese spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Ausbreitung eines Tumors. Als Tumorangiogenese bezeichnet man die Proliferation eines Netzwerks von Blutgefäßen, das in ein Krebsgeschwür eindringt und dieses mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Außerdem werden durch diese Gefäße Abfallprodukte abtransportiert und Krebszellen können zu anderen Körperstellen wandern und dort neue Geschwüre bilden. Die Tumorangiogenese beginnt damit, dass Tumorzellen Signalmoleküle an umliegende gesunde Wirtszellen aussenden, die bestimmte Gene aktivieren, um das Wachstum von neuen Blutgefäßen

einzuleiten. 1971 stellte Judah Folkman in einer bahnbrechenden Veröffentlichung die Hypothese auf, dass Tumore auf die Versorgung mit Blutgefäßen angewiesen sind, um über eine minimale Größe von 2 bis 3 mm hinaus zu wachsen. Er berichtete, dass Tumore in einem sog. "Schlafzustand" verbleiben, bis sie eine bestimmte Größe erreichen und Signale produzieren und aussenden, die zur Aktivierung von benachbarten vaskulären Endothelzellen führen. Er vermutete weiter, dass dadurch die neugebildeten Blutgefäße den Tumor vaskularisieren und mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen (77).

Basierend auf Folkman's Erkenntnissen konnten in der Folgezeit verschiedene Moleküle mit pro-angiogenen, aber auch mit anti-angiogenen Eigenschaften identifiziert werden. Nach heutigem Wissensstand ist die Bildung neuer Blutgefäße für das Wachstum solider Tumoren und für die Metastasierung essentiell.

Angiogenese wird durch Aktivatoren und Inhibitoren reguliert. Normalerweise sind Inhibitoren die dominierenden Moleküle und unterdrücken die Gefäßneubildung. Bei einem Bedarf an neuen Blutgefäßen, wie im Falle des Tumorwachstums, wird die Herstellung von aktivierenden, pro-angiogenen Faktoren gesteigert. Tumorzellen produzieren beispielsweise "vascular endothelial growth factors" (VEGFs) oder "fibroblast growth factors" (FGF1, FGF2, bFGF), die an spezifische Rezeptoren auf vaskulären Endothelzellen (z.B. VEGFR2) binden und diese Zellen dadurch aktivieren (Abb. 6).

Zur Proteinfamilie der VEGFs gehören VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und "placental growth factor" (PIGF). Der am besten charakterisierte Signaltransduktionsweg ist jener von VEGF-A und seinen Rezeptoren. Der Verlust eines VEGF-A Allels ist im embryonalen Stadium der Maus letal (78). VEGF-A bindet an die beiden Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR1 und VEGFR2 auf Endothelzellen, wobei VEGFR2 den Hauptrezeptor für die Signalübertragung darstellt.



Abb. 6 Aktivierung von Endothelzellen bei der Angiogenese. Die Tumorzelle sekretiert Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF, die an Oberflächenrezeptoren (VEFGR2) auf Endothelzellen binden und diese dadurch aktivieren. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) werden von aktivierten Endothelzellen ausgeschüttet und bauen die extrazelluläre Matrix (EZM) ab, wodurch die Endothelzellen in das Gewebe wandern und sich teilen können. Abbildung modifiziert von "National Cancer Institute fact sheets" (www.cancer.gov).

Die Rolle von VEGFR1 in der Angiogenese ist noch nicht detailliert untersucht. Unter bestimmten Bedingungen fungiert VEGFR1 als negativer Regulator und verhindert die Bindung von VEGF-A an VEGFR2. VEGFR1 ist auch beteiligt an der Induktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die von den aktivierten Endothelzellen produziert und sekretiert werden (79). Diese Enzyme bauen die extrazelluläre Matrix (EZM) des umliegenden Gewebes ab und dadurch können aktivierte Endothelzellen leichter in das Gewebe einwandern und sich dort teilen (Abb. 6). Die neu gebildeten Zellen formen im Zellverbund hohle Röhren und entwickeln ein ausgereiftes Netzwerk von Blutgefäßen, das den Tumor versorgen kann (79). Durch die Bindung von VEGF-A an VEGFR2 werden unterschiedliche Signalwege aktiviert, die zur Überexpression von Genen führen, die an der Proliferation und Migration von Endothelzellen beteiligt sind, sowie deren Überleben und die vaskuläre Permeabilität fördern.

Der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)-Akt-Signalweg führt beispielsweise zu einem verstärkten Überleben von Endothelzellen.

Weitere Rezeptoren auf Endothelzellen sind VEGFR3 und Neuropiline (NRPs). VEGFR3 ist fast ausschließlich auf dem lymphatischen Endothel vorhanden und könnte an der Lymphangiogenese beteiligt sein, die durch den Wachstumsfaktor VEGF-C induziert wird (80). Neuropiline haben keine Tyrosinkinase-Aktivität, können aber als Co-Rezeptoren für VEGFR2 agieren und sind somit mögliche Zielmoleküle für die Anti-Angiogenese (78).

VEGF-A wird in den meisten menschlichen Tumorarten synthetisiert. Die Ursache für die mitunter starke Produktion von VEGF-A liegt wahrscheinlich in den zahlreichen genetischen (Onkogene) und epigenetischen (Hypoxie, Zytokine) Möglichkeiten, durch die VEGF-A induziert werden kann (78). Die Genexpression von VEGF-A wird durch sauerstoffarme Bedingungen ("Hypoxie") gefördert. Ein Charakteristikum von soliden Tumoren sind hypoxische Bedingungen. Die Induktion von VEGF-A in Tumoren wird durch den Transkriptionsfaktor "hypoxia inducible factor" (HIF) vermittelt (79). Eine hohe Expression an VEGF-A ist meistens mit einer schlechten Prognose für Tumorpatienten verbunden. Mit der Hochregulierung von VEGF-A wird auch ein breites Spektrum an Onkogenen wie beispielsweise mutiertes *ras, erbB-2/Her2* und *bcr-abl* in Verbindung gebracht (79).

Ein weiterer, kürzlich beschriebener Rezeptor-Tyrosinkinase Signalweg wird über tie-2, einer RTK auf vaskulären Endothelzellen, vermittelt. Für tie-2 gibt es zwei wesentliche Liganden, von denen Angopoietin-1 (ang-1) als Agonist und Angopoietin-2 (ang-2) als Antagonist agiert (81). Dieser Signalweg ist komplizierter zu blockieren als jener über VEGF und muss noch im Detail erforscht werden.

Als zentraler neuer Signalweg in der Angiogenese wird der "notch-deltalike ligand" (Dll) 4 Signalweg angesehen. Notch-Zelloberflächenrezeptoren (z.B. notch 1, 2, 3 und 4) werden auf verschiedenen Zelltypen exprimiert und interagieren mit Transmembranliganden (z.B. Dll4) auf benachbarten Zellen. Knockout-Mäuse, die nur ein *Dll4* Allel besitzen, sterben im Embryo-Stadium, genauso wie im Fall von VEGF (82). Die notch-Dll4 Signalübertragung ist essentiell wichtig für die Gefäßentwicklung während der Embryogenese. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass dieser Signalweg ein wesentlicher Stimulus der Angiogenese sein könnte (78).

Zur negativen Regulation der Tumorangiogenese sind in der Literatur Angiogenese-Inhibitoren beschrieben. Beispielsweise hemmen Angiostatin, Endostatin und Thrombospondin spezifisch die Proliferation und Migration von Endothelzellen, sowie die Formation von Gefäßen, wie in *in vitro* Versuchen gezeigt werden konnte (83). Der genaue Mechanismus der Inhibition der Angiogenese durch verschiedene Moleküle ist noch nicht aufgeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend ist zu festzustellen, dass die Angiogenese ein komplex regulierter Prozess ist, der durch ein Zusammenspiel von positiven (z.B. VEGF) und negativen (z.B. Angiostatin) Regulatoren gesteuert wird.

2.3.2 "Vascular endothelial growth factor receptor 2" (VEGFR2)

Es ist heute unbestritten, dass die Angiogenese ein essentieller Prozeß für das Wachstum und die Metastasierung solider Tumoren darstellt. Einige der wichtigsten und sehr spezifischen positiven Regulatoren der Angiogenese sind die "vascular endothelial growth factors" (VEGFs). Diese Proteine binden an vier verschiedene Tyrosinkinaserezeptoren auf vaskulären Endothelzellen. Hierbei handelt es sich um "vascular endothelial growth factor receptor 1" (VEGFR1 / Flt-1), VEGFR2 (KDR / fetal liver kinase 1, Flk-1), VEGFR3 (Flt-4) und Neuropilin (NRP) (84).

VEGFR2, welcher zur Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie gehört, ist das wichtigste Rezeptormolekül für VEGFs und vermittelt deren mitogene, angiogene und Permeabilitätsverstärkende Effekte in Endothelzellen. Transgene Mäuse, bei denen das VEGFR2-Gen irreversibel mutiert wurde, sterben während der Embryogenese im Uterus an Tag 9 ohne Anzeichen von Vaskulogenese oder organisierten Blutgefäßen (85). Diese Tatsache zeigt, dass VEGFR2 eine herausragende Rolle bei der Vaskularisierung und Angiogenese spielt.

Der murine VEGFR2 (KDR / fetal liver kinase 1, Flk-1) ist ein 200 kDa großer, hoch affiner Rezeptor für VEGF und gehört zur Untergruppe "flt" der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (76). Wie in Abb. 7 zu sehen, besitzen diese Kinasen typischerweise sieben extrazelluläre Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen am N-Terminus, eine Transmembrandomäne sowie eine konservierte intrazelluläre Tyrosin-Kinase Domäne am C-Terminus (80). Nach der Bindung des Liganden VEGF an den Rezeptor VEGFR2 dimerisiert dieser und dessen intrazelluläre Tyrosine werden sehr effizient phosphoryliert. Dadurch wird eine Signalkaskade in den vaskulären Endothelzellen ausgelöst, die zur Induktion der Mitose (Mitogenese), zu Chemotaxis und zu Veränderungen der Zellmorphologie führt. Durch den molekularen PLC-PKC-Raf-Mek-Erk (MAPK) Signalweg wird beispielsweise die Initiation der DNA-Synthese und des Zellwachstums ausgelöst, was zur Proliferation der Endothelzellen führt (78).



Abb. 7 Der murine Zelloberflächenrezeptor VEGFR2. VEGF-Tyrosinrezeptoren bestehen aus sieben extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen (rot und nummeriert), einer Transmembrandomäne (gelb) und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne (grün). Die vor Kurzem identifizierten immunodominanten MHC Klasse I Epitope (KDR2 und KDR3) befinden sich in den Ig-ähnlichen Domänen 4 bzw. 6.

Die Synthese von VEGFR2 wird in proliferierenden Endothelzellen und deren Vorläuferzellen aus dem Knochenmark hochreguliert, aber nicht in Tumorzellen. Eine besonders starke Expression weist VEGFR2 in aktivierten Endothelzellen auf, die Tumorzellen versorgen. Dieser Rezeptor spielt daher eine sehr wichtige Rolle in der Tumorangiogenese.

Außerdem wird VEGFR2 auf der Oberfläche der Zellen mehrerer Tumorarten wie B-Zell-Lymphom und Leukämie (86), multiples Myelom (87), urothelialer Blasenkrebs (88), Brustkrebs (89) und Lungenkrebs (90) produziert.

Khleif und Kollegen haben 2006 H-2D^b-spezifische CD8⁺T-Zell-Epitope des murinen VEGFR2 identifiziert und beschrieben (80). Die immunogenen Epitope KDR2 bzw. KDR3 befinden sich in den Ig-ähnlichen Domänen 4 (AS 352-411) bzw. 6 (AS 552-651) des VEGFR2 Proteins (siehe Abb. 7). KDR2 und KDR3 sind H-2D^b-spezifische CD8⁺T-Zell-Epitope mit den Aminosäuresequenzen VILTNPISM bzw. FSNSTNDILI.

Sun und Kollegen haben kürzlich HLA-A*0201-spezifische CD8⁺T-Zell-Epitope des humanen VEGFR2 (auch KDR genannt) entdeckt (58). Diese Epitope können als

Zielmoleküle für zytotoxische T-Lymphozyten dienen und so für die Immuntherapie in der Anti-Angiogenese eingesetzt werden.

VEGFR2 ist der wichtigste Rezeptor für VEGF-A und vermittelt dessen angiogene, mitogene und permeabilisierende Effekte in Endothelzellen. Er ist beteiligt am Tumorwachstum, an der Tumorinvasion und der Tumormetastasierung. Aufgrund dieser Eigenschaften stellt dieser Endothelzellrezeptor einen wichtigen Angriffspunkt in der Anti-Angiogenese und daher auch in der Bekämpfung von Krebs dar.

2.3.3 Anti-Angiogenese als Therapiekonzept

Die Anti-Angiogenese geht zurück auf die Hypothese von Judah Folkman, die besagt, dass das Tumorwachstum abhängig von der Angiogenese ist. Er mutmaßte, dass Tumore eine effiziente Versorgung mit Blutgefäßen (Angiogenese) benötigen, um über eine minimale Größe von 2 bis 3 mm hinaus wachsen zu können und sich auszubreiten (91). Bei dieser Strategie zur Bekämpfung von Krebs werden nicht die Krebszellen selbst angegriffen, sondern primär die aktivierten vaskulären Endothelzellen, die das Tumor-versorgende Blutgefäßsystem bilden. Das Ziel dieser Therapie ist, die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff zu unterbinden.

Ein entscheidender Vorteil dieser Strategie besteht darin, dass Endothelzellen genetisch stabil sind und sehr wahrscheinlich keine Resistenzmechanismen gegen die Therapie entwickeln. Ein weiterer Vorteil der Anti-Angiogenese ist ein Multiplikatoreffekt, der dadurch entsteht, dass eine Endothelzelle normalerweise Hunderte von Tumorzellen versorgt. Außerdem ist diese Strategie auf verschiedenste Tumorarten anwendbar, weil jeder Tumor mit Blutgefäßen versorgt werden muss, um wachsen zu können.

Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung bei der Angiogenese sind die meisten Medikamente gegen VEGF und VEGFR2 bzw. gegen Komponenten dieses Signaltransduktionsweges gerichtet (92).

In der klinischen Forschung und Medikamentenentwicklung durch Biotechnologie- und Pharmafirmen spielen Angiogenese-Inhibitoren bei der Krebstherapie eine wichtige Rolle. Wie aus Tab. 1 ersichtlich, sind mit Bevacizumab, Sunitinib und Sorafenib bereits drei Produkte als Krebsmedikamente zugelassen. Das Zielmolekül dieser Medikamente ist vor Allem die Kinase VEGF. Als weitere Angiogenese-Inhibitoren befinden sich mehrere

Moleküle und Antikörper in Phase III der klinischen Entwicklung. Diese Moleküle sind gegen VEGF oder Rezeptor-Tyrosinkinasen wie VEGFR2 gerichtet (93).

Medikament	Hersteller	Getestet in folgenden Krebsarten
Bevacizumab (Avastin)	Genentech	Niere, Eierstock, Hirn, Prostata, Leber, Pankreas, Lymphom, Magen, Magen-Ösophagus
Sunitinib (Sutent)	Pfizer	Breast, Niere, Leber, Lunge
Sorafenib (Nexavar)	Bayer	Lunge, Melanom, Pankreas
Pazopanib	GlaxoSmithKline	Niere, Weichteilsarkom, Lunge, Eierstock
Axitinib	Pfizer	Niere
XL184	Exelixis	Schilddrüse
BIBF1120	Boehringer Ingelheim	Lunge, Gallenblase
Cediranib (Recentin)	AstraZeneca	Kolorektales Karzinom, Hirn, Eierstock
Aflibercept (VEGF Trap)	Regeneron, Sanofi - Aventis	Lunge, Prostata, Pankreas, kolorektales Karzinom
Brivanib	Bristol-Myers Squibb	Leber, kolorektales Karzinom
Vandetanib (Zactima)	AstraZeneca	Lunge

Tab. 1Angiogenese-Inhibitoren in der klinischen Entwicklung (aus Nature, Vol 458, 9 April 2009). Die
rot dargestellten Medikamente sind bereits auf dem Markt.

Es gibt verschiedene Ansatzpunkte in der Anti-Angiogenese Forschung. Man versucht beispielsweise, den Abbau des Bindegewebsgerüstes und die Invasion von neugebildeten Blutgefäßen in Tumore zu verhindern. Eine andere Möglichkeit ist die Blockade der Endothelzellaktivierung (z.B. durch Endostatin und Caplostatin), sowie der Produktion von angiogenen Faktoren (z.B. durch Erlotinib) und deren Rezeptoren. Es ist auch möglich, die angiogenen Proteine (z.B. VEGF) zu neutralisieren, wie das Medikament Bevacizumab eindrucksvoll beweist (94). Außerdem inhibiert man den VEGF Signaltransduktionsweg durch den Einsatz von Peptiden, die die Bindung zwischen VEGF und VEGFR2 blockieren und so die intrazelluläre Transduktion des VEGF-Signals verhindern (92).

Die größte Herausforderung an DNA-Vakzine gegen Krebs ist das Durchbrechen der peripheren T-Zell-Toleranz gegen Tumorselbstantigene und die Generierung einer effektiven, langlebigen Tumorimmunität, die die effektive Unterdrückung der Tumorangiogenese beinhaltet. Niethammer und Kollegen konnten in verschiedenen Maus-Tumormodellen eine deutliche Reduktion der Neovaskularisierung durch präventive DNA-Vakzinierung gegen VEGFR2 zeigen und somit die DNA-Vakzinierung als Möglichkeit der Anti-Angiogenese etablieren (95;96).

In neueren Studien wird zunehmend der Synergie-Effekt von Chemotherapie und Anti-Angiogenese unter dem Begriff "metronome Therapie" beschrieben (70;71). Anti-Angiogenese Medikamente könnten demnach universell einsetzbare Moleküle sein, die

Krebszellen sensitiver für zytotoxische Chemotherapeutika machen. Die Ergebnisse von klinischen Versuchen ergaben vielversprechende Hinweise darauf, dass bestimmte Anti-Angiogenese Medikamente diesen Effekt hervorrufen könnten (97).

2.3.4 Angiogenese und Metastasierung

In der Krebsdiagnostik, der chirurgischen Therapie, Patientennachsorge und Kombinationstherapie gibt es zwar gute Fortschritte, aber die Metastasenbildung, vor Allem jener Tumorarten, die auf konventionelle Therapien nicht ansprechen, bleibt trotzdem der Hauptgrund für Morbidität und Mortalität im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen (98). Die Streuung von Krebszellen ist eine charakteristische Eigenschaft von malignen Tumoren. Die Sekundärtumore entwickeln sich unter Umständen an weit vom Primärtumor entfernten Stellen.

Die Metastasierung geschieht in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten: Zuerst lösen sich Tumorzellen vom Primärtumor ab, durchbrechen Blutgefäße und siedeln sich in anderen Körperregionen an. Metastasierung ist ein sehr ineffizienter Prozess, weil nur sehr wenige streuende Tumorzellen, die das Blutgefäßsystem erreichen, wirklich eine Metastase in einem Sekundärorgan bilden. Die Metastasierung beginnt damit, dass Tumorzellen die Basalmembran durchbrechen und sich aktiv durch das interstitielle Gewebe bewegen. Danach folgt die Invasion in ein fragiles und permeables neues Blutgefäß. Die Tumorzelle wird mit dem Blutfluss abtransportiert, verlässt aktiv das Gefäß und vermehrt sich mittels Zellteilung (Intravasation). Nach der Verbreitung müssen Tumorzellen dann wieder an das Endothel adhärieren und im Sekundärorgan das Gefäßsystem verlassen (Extravasation). Neben der Proteolyse und Adhäsionsvorgängen ist für die Etablierung und Proliferation der Metastasen insbesondere die Neubildung von Blutgefäßen, die Neoangiogenese, ausschlaggebend (99;100). Damit startet der Vorgang der Tumorangiogenese an dieser sekundären Stelle erneut.

Im Wesentlichen ist dieser Prozess unabhängig von der Art des soliden Tumors und vom Entstehungsort. Die Blockierung der Aktivität von VEGF-A oder der Funktion seiner Rezeptoren (z.B. VEGFR2) hat in zahlreichen Tier-Tumormodellen die Reduktion des Tumorwachstums und der Metastasierung zur Folge gehabt (85;101;102). Die Angiogenese ist ausschlaggebend für die Verwandlung von Mikrometastasen in makroskopische Metastasen. Wenn die Angiogenese inhibiert ist, kommt es durch die fehlende Blutgefäßversorgung zur

Bildung sog. schlafender Mikrometastasen, bei denen sich Apoptose und Zellteilung im Gleichgewicht befinden (99). Im Experiment war die Blockade der Angiogenese assoziiert mit einer verminderten Metastasierung von intravenös applizierten Tumorzellen (100). Der Grund hierfür war eine verstärkte Apoptoserate im Gegensatz zur Zellteilung am Ort der Metastasierung. Deshalb sorgt die Angiogenese wahrscheinlich dafür, dass metastasierende Tumorzellen den "schlafenden" Zustand verlassen können, indem sie die Apoptose inhibiert (100). Pan und Kollegen zeigten, dass sich durch aktive kombinatorische Vakzinierung gegen VEGFR2 und IFNγ mit Hilfe dendritischer Zellen die Effektivität des anti-metastatischen Effekts erhöht (103). Neue Studien belegen, dass die Mechanismen, die Metastasierungen steuern, unabhängig von der Entwicklung primärer Tumoren reguliert werden können (99). Diese und weitere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass eine anti-angiogene und anti-proteolytische Therapie ein sinnvoller Ansatz sein kann, um das Metastasenwachstum zu unterbinden. Den Erfolg dieses Vorhabens durch den Einsatz synthetischer oder endogener Substanzen wird die weitere Grundlagen- und klinische Forschung zeigen müssen.

2.4 Tumorvakzinierung gegen VEGFR2

Ein geeignetes Zielmoleküle in der Anti-Angiogenese Tumortherapie stellt VEGFR2 dar. Ein Grund dafür ist, dass dieser Rezeptor auf vaskulären Endothelzellen, die die Tumorangiogenese steuern, sehr stark exprimiert und hochreguliert wird im Vergleich zu normalen Endothelzellen (104). VEGFR2 ist der wichtigste Rezeptor für VEGF-A, den wesentlichen Wachstumsfaktor bei der Angiogenese und trägt daher entscheidend zu Tumorwachstum, Tumorinvasion und Metastasierung bei (105). Außerdem wird VEGFR2 auf der Zelloberfläche verschiedener Tumortypen synthetisiert (104).

Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie beispielsweise SU5416, sind sehr effektiv bei der Therapie von bestimmten Krebsarten in *in vivo* und *in vitro* Versuchen (106;107). Monoklonale Antikörper gegen VEGFR2 können die Tumorangiogenese blockieren und das Wachstum von verschiedenen humanen und murinen Tumorarten in Tiermodellen verhindern (108). Jedoch erfordern diese Strategien die regelmäßige oder kontinuierliche Gabe der Antikörper bzw. Inhibitoren in relativ hoher Dosis. Dies könnte Unverträglichkeit und schwere Nebenwirkungen zur Folge haben.

Daher wurde versucht, als alternative Methode Vakzinierungsstrategien gegen VEGFR2 zu entwickeln. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass das Tumorwachstum durch eine Vakzin-

Immuntherapie (DNA-Vakzinierung) mit VEGFR2 als Zielmolekül blockiert werden konnte. Die DNA-Vakzinierung erfolgte mit der DNA des gesamten ORFs von VEGFR2 (96), mit dendritischen Zellen (DCs), die mit VEGFR2 Protein vorinkubiert wurden (109) oder solchen DCs, die mit der mRNA, die VEGFR2 kodiert, transfiziert wurden (110). Bei den ersten beiden Studien wurde gezeigt, dass CTLs für den Anti-Tumor Effekt verantwortlich sind. Dies würde bedeuten, dass CTLs, die bei der Immunisierung gegen VEGFR2 gebildet werden, Endothelzellen von Tumor-assoziierten Blutgefäßen zerstören können.

Interessanterweise spielt dieses Prinzip auch bei einer nicht tumorösen Erkrankung eine Rolle. Mochimaru und Kollegen konnten bei ihren Untersuchungen zur Augenkrankheit "Altersabhängige Makuladegeneration" (AMD) zeigen, dass die pathogene choroidale Neovaskularisierung in der Netzhaut durch eine Peptid-Vakzinierung gegen VEGFR2 inhibiert werden konnte (111). Khleif und Kollegen bewiesen experimentell, dass CTLs alleine, ohne die Hilfe von Antikörpern, die Angiogenese und das Tumorwachstum effektiv unterdrücken können (80). Sie identifizierten murine immunodominante MHC I-Epitope von VEGFR2 und untersuchten die Wirksamkeit eines Peptid-Impfstoffes gegen VEGFR2 zur Blockade der Tumorangiogenese im Mausmodell (80).

Niethammer und Kollegen verabreichten im Mausmodell einen oralen DNA-Impfstoff gegen VEGFR2 mit Hilfe von attenuierten Salmonella typhimurium als Vehikel (96). Dieser DNA-Impfstoff schützte Mäuse effektiv vor dem Wachstum von Melanom-, Kolonkarzinom- und Lungenkarzinomzellen und reduzierte das Auftreten von Metastasen in einem therapeutischen Versuchsansatz. Das CD8⁺T-Zell-vermittelte Abtöten von Endothelzellen bedeutet, dass die periphere Immuntoleranz gegen dieses Selbstantigen durchbrochen wurde und führte zur drastisch verringerten Ausbreitung von spontanen und experimentellen Lungenmetastasen. Die Produktion von zytotoxischen CD8⁺T-Zellen ist von entscheidender Bedeutung, weil sie in der Lage sind, spezifisch bestimmte Zellen aufzufinden und abzutöten. Sie erkennen mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) 8 bis 10 Aminosäuren (AS) lange Antigene (Epitope). Diese Peptide bzw. Epitope werden im Zytosol von APCs durch proteolytischen Verdau der Antigene im Proteasom hergestellt und auf der Zelloberfläche auf MHC Klasse I-Molekülen präsentiert. Ein vorrangiges Ziel von Tumorvakzinen ist die Generierung von solchen Epitopspezifischen zytotoxischen CD8⁺T-Zellen, die das Abtöten von Tumorzellen gewährleisten und deren erneutes Auftreten verhindern (112;113). Des Weiteren konnten Niethammer und Kollegen im Mausmodell zeigen, dass die Angiogenese im Tumorgefäßsystem unterdrückt

30

wurde, ohne Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit, neuromuskuläre Fähigkeit oder Hämatopoese zu haben. Allerdings kam es bei der Wundheilung zu Verzögerungen.

2.5 Tumormodelle in der Maus

In den letzten Jahren wurden Dank technischer Fortschritte wie Expressionsklonierung und biochemischer Identifizierung von immundominanten antigenen Epitopen viele Tumorassoziierten Antigene (TAA) entdeckt. Trotzdem scheiterten darauf basierende Tumorimmuntherapien regelmäßig, obwohl die Antigenität der Tumore zweifelsohne vorhanden ist. Die Ursache hierfür wird in der Regulation von T- und B-Zell-vermittelten Anti-Tumor Immunantworten, sowie in der Rolle des angeborenen Immunsystems und in der Regulation von APCs gesucht (114).

Um Antworten auf diese Fragestellungen der Anti-Tumor-Immunität zu finden, wurden verschiedene murine Tumormodelle entwickelt. Ein besseres Verständnis der komplizierten Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem ist die Grundvoraussetzung für eine mögliche schützende Anti-Tumorantwort in Patienten (115).

Dabei wird darauf Wert gelegt, einerseits die Auswirkungen der angeborenen und adaptiven Immunantwort auf das Tumorwachstum *in vivo* zu verstehen und andererseits neuartige, innovative Immuntherapien zur Prävention und Behandlung von primären und metastatischen Tumoren zu entwickeln (65).

Diese Forschungsgebiete beinhalten hochkomplexe Tumor-Wirt-Interaktionen und können nicht in *in vitro* Modellen untersucht werden. Deshalb sind die meisten Experimente in der Tumorimmunologie abhängig von Tiermodellen. Dafür werden Tumorzellen verwendet, die aus genidentischen Wirten isoliert wurden, weil Tumore artspezifische und "major" und "minor histocompatibility complex" (MHC) Antigene exprimieren. Die meisten Tumormodelle und maligne Tumorzelllinen existieren in Mäusen. Es gibt zwei Kategorien von Modellen, transplantierte Tumore und solche, die *in vivo* entstanden und *in situ* im ursprünglichen Tier untersucht werden. Ein Beispiel für *in vivo* Tumormodelle sind SV40 transgene Mäuse, die spontan einen Prostatatumor entwickeln (116).

In dieser Arbeit wurden transplantierte Tumormodelle verwendet. Die dabei verwendeten Tumorzellen können zwischen Individuen eines Inzuchtstamms transplantiert oder *in vitro* in Zellkultur gehalten werden. Sie wurden aus spontanen Tumoren isoliert oder entstammen Krebszellen, die durch Bestrahlung, Karzinogene oder Onkogene entstanden. Eine bekannte

Melanomzelllinie ist B16F10. Diese Tumorzellen können sowohl subkutan als Flankentumormodell (117) als auch intravenös als künstliches Metastasierungsmodell appliziert werden (118;119). Diese Tumorzelllinie ist nur schwach immunogen und daher ist eine spontane Abstoßung des Tumortransplantats im Mausmodell nicht zu erwarten. Beim experimentellen Metastasierungsmodell wird die hämatogene Metastasierung durch intravenöse Injektion der Tumorzellen simuliert. Diese Methode ist eine Alternative zu spontanen Metastasierungsmodellen.

Die meisten experimentellen Tumormodelle in Tieren sollen menschliche Tumoren imitieren. Aufgrund physiologischer und biochemischer Unterschiede zwischen Mensch und Tier ist dies nur begrenzt möglich, aber die Tiermodelle spielen trotzdem eine wichtige Rolle in der Tumorimmunologie. Unter verschiedenen Versuchsbedingungen kann die Effektivität neuartiger Impfstoffrezepturen getestet, die Antigenpräsentation *in vivo* untersucht, Tumortoleranzmechanismen erforscht oder Vakzinierungsstrategien entwickelt werden (120;121).

2.6 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer neuen Vakzinierungsstrategie gegen Tumore. Es soll versucht werden, eine Salmonellen-vermittelte Immunisierung gegen den Vaskularisierungsfaktor VEGFR2 zu etablieren und deren Effekt in verschiedenen Tumormodellen in der Maus zu testen.

VEGFR2 ist der wichtigste Rezeptor auf Endothelzellen und vermittelt angiogene, mitogene und permeabilisierende Effekte. Er ist beteiligt am Tumorwachstum, an der Tumorinvasion und der Tumormetastasierung.

Bei der neuartigen Vakzinierungsstrategie (38) wird das durch die SPI-1 von Salmonellen kodierte T3SS dazu verwendet, um Antigene bzw. immundominante Epitope direkt in das Zytosol von APCs zu translozieren (siehe 2.1.3.). Dadurch werden diese Proteinfragmente auf dem MHC I-Antigenpräsentationsweg prozessiert und an der Zelloberfläche von MHC-I Molekülen präsentiert. Folglich kommt es zu einer antigenspezifischen CD8⁺T-Zellantwort. In dieser Arbeit wird ein Hybridprotein aus der N-terminalen Translokationsdomäne des Yersinien-Effektorproteins YopE und den kürzlich identifizierten immunogenen Epitopen KDR2 und KDR3 des murinen VEGFR2 molekular konstruiert (80). Die Translokation der Hybridproteine wird mittels Western Blot nachgewiesen. Daneben wird auch die

Kolonisierungskinetik der verwendeten Salmonellenstämme in verschiedenen Organen von C57Bl/6 Mäusen nach orogastrischer Infektion charakterisiert werden.

Zytotoxische CD8⁺T-Zellen sind von entscheidender Bedeutung bei der Zerstörung von Tumorzellen. Diese spezifische, Salmonellen-vermittelte CD8⁺T-Zellantwort gegen immundominante Epitope von VEGFR2 soll durch MHC I-Tetramerfärbung von murinen Milzzellen und anschließender Analyse im Durchflusszytometer gezeigt werden. Außerdem soll die Qualität der Immunantwort durch Färbung der Oberflächenmarker CD62L und CD127 auf CD8⁺T-Zellen untersucht werden, um verschiedene Subtypen (EC, EMC, CMC) von KDR2-spezifische CD8⁺T-Zellen unterscheiden zu können.

Die Effizienz der Salmonellen-vermittelten Tumorvakzinierung gegen VEGFR2 wird jeweils an einem Melanom-Flankentumormodell und einem künstlichen Metastasierungsmodell in der Maus getestet. Hier wird das Tumorwachstum bzw. die Metastasenbildung in der Lunge analysiert. Außerdem werden die Flankentumore histologisch durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht, um die Blutgefäßversorgung näher zu betrachten. Das Ziel der Vakzinierung gegen VEGFR2 ist, die Angiogenese von Tumoren zu blockieren und auf diese Weise deren Wachstum zu inhibieren.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Tab. 1 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma	
Analysenwaage	Kern 440-33	Sartorius, Göttingen	
Brutschrank	Тур В 20	Heraeus, Hanau	
Bunsenbrenner	Gasprofi 1 micro	WLD -TEC GmbH, Göttingen	
CO2-Inkubator	Cytoperm 2	Heraeus, Hanau	
Cryotom	CM1950	Leica, Wetzlar	
Durchflusszytometer	FACSCantoTMII	BD, Heidelberg	
Elektroblot- Apparatur	Mini Trans Blot® System	Bio-Rad, München	
Elektrophoresekammer für SDS-Gele	MiniPROTEAN 2® Cell System	Bio-Rad, München	
Elektroporator	Gene Pulser	Bio-Rad, München	
Filmentwickler	Fujifilm FPM-100A	Fuji, Düsseldorf	
Fluoreszenzmikroskop	BX 61	Olympus, Hamburg	
Fluoreszenzmikroskop	Leitz DMRB	Leica, Wetzlar	
Gel-Dokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad, München	
Gelelektrophoresekammern		Biometra, Göttingen	
Homogenisator	MM 2000	Retsch, Wuppertal	
Magnetrührer	IKA RET	Eppendorf, Hamburg	
PCR-Cycler	Unocycler	Mettler, Toledo	
pH-Meter	320 pH-Meter	Eppendorf, Hamburg	
Pipetten	Gilson	Limburg-Offheim	
Pipettierhilfe	Accu-Jet Pro	Brand, Wertheim	
Schüttelinkubator	Certomat BS-1	Bio-Rad, München	
Semi-Dry Blot-Apparatur	Trans-Blot SD	Bio-Rad, München	
Thermomixer	Kompakt 5350	Eppendorf, Hamburg	
Schlundsonden		Thermo Fisher Scientific, Schwerte	
Spannungsquellen	Power Pac 200 und 300	Thermo Electron Corporation, Langenselbold	
Spectrophotometer	NanoDrop ND 1000	Spectronic instruments, Rochester, USA	
Spektralfotometer	Spectronic 20	Heraeus, Hanau	
Sterilwerkbank	Herasafe HS 12	Thermo Electron Corporation, Langenselbold	
Vakuumzentrifuge	Savant DNA 110 SpeedVac	Memmert, Schwabach	
Wasserbad	WB/OB7-45	Eppendorf, Hamburg	
Zentrifugen	Eppendorf 5417C und 5810R	Sorvall, Langengelsbold	
	Sorvall super-21	Kendro, Hanau	

Neben den in Tab. 1 aufgelisteten Geräten, wurden Laborstandardgeräte eingesetzt.

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Blotting-Papier	Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel
Elektroporationsküvetten	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Einbettschalen Histologie	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Einmalspritzen (10 ml)	Braun, Melsungen
Einmalpipetten	Falcon, Osnabrück
FACS Rundbodenröhrchen	Beckton Dickinson, Heidelberg
Gel-Blotting Papier	Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel
Kanülen	Braun, Melsungen
Kodak X-Omat Röntgenfilme	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Metallkugeln	NeoLab, Heidelberg
Mikrotiterplatten 24-well	Beckton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplatten 96-well Rundboden	Hartenstein, Würzburg
Nitrocellulose-Membran (Protran, BA85)	Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonfilter 50 µm	Hartenstein, Würzburg
Objektträger Super Frost Plus	Hartenstein, Würzburg
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen (Plastik)	Greiner bio-one Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml (ERG)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml (Falcon)	Beckton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter 0,22 µm und 0,45 µm (Millex)	Millipore, Schwalbach
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one Frickenhausen
Zellschaber	Falcon, Osnabrück
Zellsiebe 70 μm	Beckton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (Plastik)	Falcon, Osnabrück

3.3 Puffer und Lösungen

3.3.1 Chemikalien

Tab. 3 Verwendente Chemikalien und Biochemikalien

1 kb DNA-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose (Premium)	Serva, Heidelberg
Antibiotika	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BHI	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA	PAN, Aidenbach
CFSE	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cytofix/ Cytoperm	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA
CytopermPlusPuffer	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA
D-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
DAPI	Sigma-Adrich, Taufkirchen
DNA-Aufreinigungskit	Qiagen, Hilden

DNase I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
dNTP Mix	Lonza, Verviers, Belgien	
D-PBS	Invitrogen, Karlsruhe	
ECL Western Blotting Reagents	GE Healthcare (Freiburg)	
EDTA	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Einbettmedium Tissue Tek	Hartenstein, Würzburg	
EMA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Eosin Y	Merck, Darmstadt	
Ether	Roth, Karlsruhe	
FACS-Antikörper	Natutec, Frankfurt	
FCS	Invitrogen, Karlsruhe	
Fuji RX New 13x18	Fuji, Düsseldorf	
Gentamicin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Glycerin	Roth, Karlsruhe	
GolgiPlugTM (Brefeldin A)	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA	
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm	
Immobilon-P PVDF Transfer Membran	Millipore GmbH, Eschborn	
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim	
Kaisers Glyzeringelatine	Merck, Darmstadt	
Kernechtrot-Aluminium-Lösung	Roth, Karlsruhe	
Kodak X-Omat Röntgenfilme	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Kollagenase VIII	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
LB Agar	Invitrogen, Karlsruhe	
LB Medium	Invitrogen, Karlsruhe	
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe	
MgCl ₂	Lonza, Verviers, Belgien	
Millex-HV Filter 0.45 um	Millipore GmbH. Eschborn	
Mounting Medium Mowiol für Mikroskopie	Merck, Darmstadt	
N-Acetyl-D-Galaktosamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden	
PCR-Aufreinigungskit	Biomol, Hamburg	
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe	
PermWash	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA	
PFA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Polymerase-Puffer	Lonza, Verviers, Belgien	
Precision Plus Proteinstandard prestained	Bio-Rad, München	
Primer	Metabion, Martinsried	
Proteinstandard "BenchMark Pre-Stained"	Invitrogen, Karlsruhe	
Protogel	national diagnostics, Atlanta, USA	
Protran BA Nitrozellulose Transfer Membran	Schleicher und Schüll. Dassel	
Protran BA85 Nitrozellulose Transfer Membran		
150 x 150 mm	Schleicher und Schüll, Dassel	
Resorcin-Fuchsin-Lösung	Roth, Karlsruhe	
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt	
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe	
SDS	Serva	
SeeBluePlus2 Proteinmarker	Invitrogen, Karlsruhe	
Streptavidin-PE	Invitrogen, Karlsruhe	
Takara DNA Polymerase	Lonza, Verviers, Belgien	

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tetramere	Dr. Dirk H. Busch, TU München
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris	MP, Ohio, USA
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
WestPico Luminol/Enhancer	Pierce, Sankt Augustin
WestPico Stable Peroxid	Pierce, Sankt Augustin
Yeast-Extrakt (Hefe-Extrakt)	MP, Ohio, USA
T4 DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe

3.3.2 Nährlösungen

Tab. 4 Hergestellte Nährlösungen

Puffer	Zusammensetzung
ACT	NH ₄ Cl 0,15 M; Tris/HCl 0,017 M, pH 7,4
Agarosegel	0,5 bis 1,5% Agarose in TAE-Puffer
Coomassie- Lösung	0,25% Coomassie Brilliant Blue R250; 5% Eisessig; 50% Ethanol
	0.5% SDS, 25 mM EDTA pH 8.0, 25% Glycerin, 0.01% (w/v) Orange
5 x DNA Probenpuffer	G
Einfriermedium für Bakterien	LB-Medium mit 15 % Glycerin
Einfriermedium für Zellen	2,7 ml inaktiviertes FCS, 300 µl DMSO
Entfärberlösung	50% Methanol, 7,5% Essigsäure
Ethidiumbromid-Färbebad	1 μg Ethidiumbromid pro ml H ₂ O _{dest}
FACS-Puffer	DPBS, BSA 0,5 % (M/V), NaN3 0,02 % (V/V), pH 8,0
HCl-Alkohol	97,3 ml 96% Ethanol + 2,7 ml 37% HCl
Luria-Bertani-Medium (LB-	10g/L Bacto-Trypton, 5g/L Bacto-Hefeextrakt
Medium)	5g/L NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/L Bacto-Agar
LB-NaCl	Luria- Bertani- Medium mit 0,3 M NaCl
1x Laemmli	Glycin 2 M; Tris 250 mM, SDS 1 % (M/V)
PBS	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L H ₂ O
PBST	PBS mit 0,5 % Tween20 (M/V)
PFA 4 %	PFA 4 % (M/V) in PBS, pH 7,4, sterilfiltrieren
PLP-Medium	12,5 ml 4% Paraformaldehyd; 18,75 ml 0,2M L-Lysine pH 7,4; 18,75
	ml P-Puffer pH 7,4;0,106 g NaIO4
P-Puffer (0,1M, pH 7,4)	81 ml 0,2M Na ₂ HPO ₄ , 19 ml 0,2M NaH ₂ PO ₄ , 100 ml H ₂ O, pH 7,4
Sammelgel	H ₂ Obidest 2,2 ml; ProtoGel®x 630 µl; 4x Tris/HCL (pH 6,8) 940 µl;
	APS (10 %) 25 μl; TEMED 5 μl
SDS-Probenpuffer 4x	Tris/HCl pH 6,8 2,5 %; SDS 0,35 M; Bromphenolblau 0,1 % (4,0 mg)
	(M/V); Glycerin 2 % (V/V), β - Mercaptoethanol 0,4 ml
Standard-Zellkulturmedium	RPMI 1640, FCS 10 % (V/V), Penicillin (10000 U/ml) 1 % (V/V),
	Streptomycin (10 mg/ml) 1 % (V/V), L-Glutamin 1% (V/V)
TAE-Puffer	40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 1mM EDTA

Transferpuffer	Glycin 190 mM, Tris 25 mM, SDS 0,1 % (M/V), Methanol 20 % (V/V), pH 8,3
Trenngel	H_2O_{bidest} 3,1 ml; ProtoGel®x 2,5 ml; 4x Tris/HCl (pH 8,8) 1,9 ml; APS (10 %) 50 µl; TEMED 5 µl
4x Tris/HCl pH 6,8	Tris/HCl 0,5 M; SDS 0,4 % (M/V); pH 6,8
4x Tris/HCl pH 8,8	Tris/HCl 1,5 M; SDS 0,4 % (M/V), pH 8,8
T-Zellmedium	RPMI 1640, FCS 10 % (V/V), Penicillin (10000 U/ml) 1 % (V/V), Streptomycin (10 mg/ml) 1 % (V/V)
Trypanblau- Lösung	0,05 g in 10 ml DPBS, sterilfiltrieren
Waschpuffer SDS-PAGE	PBS mit 0,5 % BSA (M/V)

3.3.3 Antibiotika

Tab. 5	Antibiotika	für	Kultivierung v	von	Bakterien

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	H ₂ O _{dest}	10 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	70 % Ethanol	2 mg/ml	20 µg/ml
Kanamycin	H ₂ O _{dest}	5 mg/ml	50-200 µg/ml
Tetrazyklin	70 % Ethanol	2 mg/ml	20 µg/ml
Streptomycin	H ₂ O _{dest}	8 mg/ml	32 µg/ml

Die in Tab. 5 genannten Antibiotika wurden für die Kultivierung von Bakterien (Salmonellen) in Flüssig- und Festkulturen verwendet.

3.4 Bakterienstämme, Plasmide und eukaryontische Zelllinie

Der Genotyp und die Herkunft der verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 6 aufgelistet. In Tab. 7 sind die Plasmide aufgeführt und in Tab. 8 wird die Tumorzelllinie näher beschrieben, die in dieser Arbeit verwendet wurde.

Tab. 6	Verwendete Bakterienstämme,	deren	Eigenschaften	und Herkunft
--------	-----------------------------	-------	---------------	--------------

Stamm	Genotyp/Charakteristische Eigenschaften	Referenz/Herkunft
	recA1 endA1 hsdB17(r-m+)	
E coli DH50	supE44, relA1, $gvrA96$, thi-1,	
	deoR, F-, I-, f80dlacZDM15,	
	D(lacZYA-argF), U169, phoA	Woodcock et al., 1989 (122)
	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)	
	ϕ 80lacZ Δ M15	
E. coli TOP10	Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-	
	leu)7697 galU	
	galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen

SB824	Salmonella enterica serovar Typhimurium: Mutation <i>sptP:kan</i> aus dem Stamm SB237 in den $\Delta aroA$ -Stamm SL3261	H. Rüssmann (38)
SB824 (pHR231)	SB824 mit pHR231	H. Rüssmann
SB824 (pHR580)	SB824 mit pHR580	diese Arbeit
SB824 (pHR583)	SB824 mit pHR583	diese Arbeit
SB824 (pHR584)	SB824 mit pHR584	diese Arbeit
S. dublin BRD620	ΔaroA/aroD	M. Roberts (17)
S. dublin BRD620 (pHR584)	S. dublin BRD620 mit pHR584	diese Arbeit

 Tab. 7
 Plasmide mit detaillierten Eigenschaften

Plasmid	Ursprungsvektor	Promotor	Plasmid- kodiertes Protein	Referenz
pHR241	pWSK29	lac	SycE, YopE1-138/p60 ₁₃₀₋₄₇₇ /M45	H. Rüssmann
pST1	pWSK29	lac	SycE, YopE1-138/pST1/M45	A. Wieser
pHR578	pWSK29	lac	SycE, YopE1-138/M45	diese Arbeit
pHR580	pWSK29	lac	SycE, YopE1-138/ec	diese Arbeit
pHR583	pWSK29	lac	SycE, YopE1-138/KDR3	diese Arbeit
pHR584	pWSK29	lac	SycE, YopE1-138/KDR2	diese Arbeit
pcDNA3.1-Flk1	pcDNA3.1	CMV	murines VEGFR2	A. Niethammer

 Tab. 8
 Eukaryontische Zelllinie, die f
 ür die Tumorexperimente verwendet wurde

Bezeichnung	Eigenschaft	Bezugsquelle	
	B16F10 Maus-Melanomzelllinie	ATCC, Manassas,	
CRL 6475	Maussstamm C57BL6/6J	USA	

3.5 Antikörper

Tab. 9 Antikörper, die für die genannten Anwendungen benutzt wurden

Spezifität	Klon	Format	Anwendung	Bezugsquelle
(anti- Maus)	-			
CD4	GK1.5	PerCp	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
	GK1.5	PE	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
CD8a	53-6.7	FITC	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
	53-6.7	APC AlexaFluor®750	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
	53-6.7	APC-eFluor 780	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
	53-6.7	APC	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
CD62L	MEL-14	FITC	FACS	Natu Tec GmbH ,Frankfurt am Main

CD127	A7R34	APC	FACS	Natu Tec GmbH ,Frankfurt am Main
IFNγ	XMG1.2	FITC	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
IgG1	R3-34	FITC	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
CD16/ CD32	93	aufgereinigt	FACS	Natu Tec GmbH ,Frankfurt am Main
IgG		Sekundär- Ak (Peroxidase gekoppelt)	WB	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn
YopE		Primär- Ak	WB	K. Ruckdeschel, Hamburg
CD31	390	FITC	IF	Beckton Dickinson, Heidelberg

3.6 Tetramere

Als Tetramere bezeichnet man in der Immunologie Konstrukte, die aus vier MHC-Molekülen und einem Antigen aufgebaut sind. In dieser Arbeit wurden MHC Klasse I Tetramere verwendet. Diese dienen zur Detektion von Antigen-spezifischen CD8⁺T-Zellen. Die Bindung der Tetramere erfolgt dabei an die entsprechenden T-Zellrezeptoren auf den CD8⁺T-Zellen.

Die Tetramere H2-K^b#45/mβ₂M/KDR2₄₀₀₋₄₀₈PE, H2-K^b#45/mβ₂M/KDR3₆₁₅₋₆₂₄PE und H2-K^d#45/mβ₂M/p60₂₁₇₋₂₂₅PE wurden freundlicherweise von Prof. Dr. D. H. Busch (TU München) zur Verfügung gestellt und werden - in Abhängigkeit des MHC Allels - für die Detektion von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in C57Bl/6 bzw. BALB/c Mäusen verwendet (123). Zur Herstellung der Tetramere wurden rekombinante H2-Kd schwere Ketten und b2-Mikroglobulin als unlösliche Einschlusskörper in E. coli exprimiert und anschließend aufgereinigt. Die H2-Kd schwere Kette wurde genetisch so verändert, dass die transmembrane und die zytosolische Domäne entfernt wurden und eine spezifische Biotinylierungsstelle am C-Terminus eingefügt wurde. Die aufgereinigten Proteine wurden in vitro in Gegenwart hoher Konzentrationen an synthetischem Peptid (Biosyntan, Berlin) rückgefaltet, um stabile, lösliche MHC/Peptid-Komplexe zu bilden. Diese Komplexe wurden in vitro spezifisch biotinyliert durch Zugabe des Enzyms BirA, Biotin und ATP. Nach weiterer Aufreinigung wurden die biotinvlierten MHC/Peptid-Komplexe mit Streptavidin-PE (SA-PE; Molecular Probes, Eugene, USA) multimerisiert. Die Tetramerkomplexe wurden durch Gelfiltration aufgereinigt und in einer Konzentration von 2 bis 5 mg/ml bei 4°C in PBS (pH 8,0) mit 0,02% Natriumazid, 1 mg/ml Pepstatin, 1 mg/ml Leupeptin und 0,5 ml EDTA im Dunkeln gelagert.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 Anzucht von Salmonellen

Für die Anzucht von *S. typhimurium* oder *S. dublin* wurde zunächst eine Übernachtkultur angesetzt. Hierfür wurden 3 ml LB-Flüssigmedium (100 μ g/ml Ampicillin bzw. Kanamycin als Selektionsmarker) mit einem Tropfen aus der Stammkultur (-70°C) angeimpft. Die Übernachtkultur wurde bei 37°C mit 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Übernachtkultur in einem Gesamtvolumen von 10 - 100 ml im Verhältnis 1:50 mit LB-NaCl Medium verdünnt. Das Wachstum der Bakterienkultur wurde mittels optischer Dichtemessung bei 600 nm (OD₆₀₀) kontrolliert. Zur Kultur auf festem Medium wurden LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin bzw. Kanamycin verwendet und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Stammhaltung wird in 1 ml LB-Medium mit 20% Glycerin bei - 80°C gelagert.

3.7.2 Molekulares Klonieren

Einige der Klonierungen erfolgten mit Hilfe des Topo TA Cloning Kits von Invitrogen. Die Klonierungsstrategie für das Herstellen eines Anti-Angiogenese-Plasmids (pHR580, pHR583 oder pHR584) war wie folgt: Um das "Backbone" für das Plasmid zu generieren, wurde eine Gradienten-PCR über das Plasmid pST1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Wieser) gemacht und gleichzeitig mittels geeigneter Primer an den Enden jeweils eine *BamHI*-Schnittstelle eingeführt. Nach Restriktionsverdau mit *BamHI* und anschließender Autoligation war der Ausgangsvektor pHR 578 fertig gestellt. Dieser Vektor ist ein pWSK29-Derivat und enthält die genetische Information für SycE, YopE₁₋₁₃₈/M45. In diesen Vektor wurden Fragmente des murinen VEGFR2 Gens (*kdr2, kdr3,* ec) kloniert (detaillierte Informationen siehe 4.1).

3.7.3 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (*"polymerase chain reaction"*, PCR) dient der Vervielfältigung von definierten DNA-Abschnitten und wurde nach Mullis (124) durchgeführt. Primer sind Oligonukleotide, die zu den Randbereichen des zu amplifizierenden Gens komplementär sind. Sie wurden von der Firma Metabion (München) hergestellt. Als DNA-Matrize wurde chromosomale DNA (50-100 ng) oder ein Bakterienzelllysat eingesetzt. Zur Gewinnung des Bakterienzelllysates wurden 100 μ l einer Übernachtkultur in 900 μ l H₂O_{dest} gekocht (95°C, 10

min) und anschließend abzentrifugiert. 1 µl des Überstandes wurde als DNA-Matrize für die PCR verwendet. Als DNA-Polymerasen wurde entweder die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems, Darmstadt) oder die Takara DNA Polymerase (Lonza) verwendet. Die Primer, die Reaktionsansätze und die verwendeten PCR-Programme sind der Tab. 10 und der Tab. 11 zu entnehmen. Die "Annealing"-Temperatur lag 2°C unter dem Schmelzpunkt der Primerpaare.

Oligonukleotid	Sequenz $(5' \rightarrow 3')$	Verwendung
	ATT GTA <u>GGA TCC</u> ATG	
pWSK29_BamHI	GAT CGT TCC CGT GAC	Amplifizierung von Vektor pHR 578 mit Einführung einer
_forw	CGT CTG CC	BamHI-Schnittstelle
pWSK29_BamHI	GAG TGT AAT CAA TAA	Amplifizierung von Vektor pHR 578 mit Einführung einer
_rev	AGT CGT C	BamHI-Schnittstelle
Flk1_KDR2_for(GCC C <u>AG ATC T</u> CG AAT	Amplifizierung von kdr2 mit Einführung einer BglII-
BglII)	CCC TGT GAA G	Schnittstelle
KDR2 BamHI r	GCC C <u>GG ATC C</u> CT GTT	Amplifizierung von kdr2 mit Einführung einer BamHI-
ev_neu	TCT CCA TTG A	Schnittstelle
Flk1_KDR3_for(GCC G <u>AG ATC T</u> AC TGT	Amplifizierung von kdr3 mit Einführung einer BglII-
BglII)	CCA ACC TGC T	Schnittstelle
KDR3 BamHI r	AAC C <u>GG ATC C</u> AT GTC	Amplifizierung von kdr3 mit Einführung einer BamHI-
ev_neu	TTT TCT TGG	Schnittstelle
Flk1_ec_for(BglI	GGG G <u>AG ATC T</u> AT GGA	Amplifizierung von ec mit Einführung einer BglII-
I)	GAG CAA GGC G	Schnittstelle
Flk1_ec_rev(Bam	GAA A <u>GG ATC C</u> GC TGG	Amplifizierung von ec mit Einführung einer BamHI-
HI)	GCA CCT TCT A	Schnittstelle

Tab. 10 Primer, die für die Klonierung zum Einsatz kamen

Tab. 11 Reaktionsansatz der PCR und Programmierung der PCR-Maschine

Reaktionsansatz	Reaktionsprogramm	
DNA 100 ng	Anfangsdenaturierung 94°C, 5 min	1x
5' Primer (100 μM) 0,5 μl		
3' Primer (100 μM) 0,5 μl	Denaturierung 94°C, 30 sek	
dNTP-Mix (2 mM) 5 μl	Annealing x°C, 30 sek	35x
10 x Reaktionspuffer 5 μl	Elongation 72°C, 1 min/kb	
DNA Polymerase 0,5 µl		
H ₂ O _{dest} ad 50 µl	Finale Elongation 72°C, 5 min	1x

3.7.4 Restriktionsverdau

Zur Erzeugung von DNA-Fragmenten und zur Linearisierung von Vektoren bzw. Plasmid-DNA wurde der Restriktionsverdau eingesetzt. Außerdem diente diese molekular-biologische Methode der Identifizierung und Kontrolle von Plasmid-DNA. Für die Durchführung der Verdaus wurden der entsprechende Reaktionspuffer 10x, falls erforderlich "bovine serum albumin" (BSA; Endkonzentration 100 μ g/ml), das Restriktionsenzym (alle New England BioLabs, Frankfurt) und Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß zusammengegeben, mit H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt und gut durchmischt. Zur Identifizierung und Kontrolle von Plasmid-DNA wurde ein Endvolumen von 20 μ l (für 1-2 μ g Plasmid-DNA) gewählt und für die Erzeugung von DNA-Fragmenten zur Klonierung 50 μ l (für 5 μ g Plasmid-DNA).

Die Temperatur und die Dauer der Inkubation wurden nach Herstellerangaben gewählt. Im Anschluss daran wurden die DNA-Fragmente über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit kommerziellen Kits aufgereinigt.

Linearisierte Vektoren wurden zur Vermeidung von Religationen für 30 min bei 37°C mit Alkalischer Phosphatase (CIAP) behandelt.

3.7.5 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA erfolgte mithilfe von kommerziellen Aufreinigungs-Kits nach den Angaben des Herstellers Qiagen (Hilden). Diese Aufreinigung war beispielsweise nötig nach PCR-Reaktionen oder nach dem Ausschneiden von Banden aus dem Agarose-Gel.

3.7.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte sowohl nach enzymatischem Restriktionsverdau, als auch nach PCR-Reaktionen mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese. Die DNA wurde mit 5 x DNA Probenpuffer gemischt, in die Taschen der horizontalen Agarosegele in Agarosegelpuffer pipettiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde eine 1 kb DNA Leiter verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V elektrischer Spannung. Bei der Elektrophorese kamen ausschließlich 0,5 bis 1,5%-ige Agarosegele mit Ethidiumbromidfärbung (5 μ l/100 ml Agarosegel) zum Einsatz. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die Visualisierung der Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Fragmente erfolgte über ein Geldokumentationssystem.

3.7.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden photometrische Messungen durchgeführt. Vor dem Messen mit dem Photometer wurde die DNA im Verhältnis 1:10 mit H₂O verdünnt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration der doppelsträngigen DNA wurde anschließend anhand der gemessenen Absorption (Abs260 nm) mit folgender Formel errechnet:

dsDNA-Konz. = $Abs_{260 nm} x OD260 x Verdünnungsfaktor$ dsDNA-Konz. [$\mu g/\mu l$] = $Abs_{260 nm} x 0,050 \mu g/\mu l x 100$

Alternativ wurde die DNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Spectrophotometer NanoDrop durchgeführt, wofür nur 1 µl DNA zur Messung nötig ist.

3.7.8 Ligation

Um während der molekularen Klonierung komplementäre DNA-Stücke zu verbinden, wurde eine Ligation durchgeführt, beispielsweise, um ein "Insert" in ein Plasmid-"Backbone" einzusetzen. Für den jeweiligen Ansatz wurde Plasmid-DNA im Verhältnis 1:3 zu "Insert"-DNA eingesetzt. Außerdem wurden 5x Ligase-Puffer und 1 µl T4 DNA-Ligase zugegeben und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt.

3.7.9 Herstellen elektrokompetenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde eine Übernachtkultur von *E. coli* DH5 α , *E. coli* TOP10 oder *S. typhimurium* SB824 in 2 ml LB-Medium hergestellt, welche anschließend 1:50 in LB-Medium verdünnt wurde (Gesamtvolumen 100 ml). Diese Kultur wurde für ca. 2,5 h bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD_{600nm} von ca. 0,6 geschüttelt und dann in vorgekühlten Falcon-Röhrchen in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 8000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 15 ml eiskaltem Ampuwa (steriles Wasser) auf Eis gewaschen und die Suspension erneut wie oben beschrieben abzentrifugiert. Nun wurde das Pellet mit 10 ml eiskaltem, filtriertem Ampuwa mit 10% Glycerin gewaschen und wieder abzentrifugiert wie oben. Abschließend wurde das Pellet in 600 µl Ampuwa mit 10% Glycerin resuspendiert, in Eppendorf Reaktionsgefäßen auf Trockeneis aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

3.7.10 Transformation

Die durch Klonierung neu hergestellten Plasmide wurden mittels elektrischer Transformation (Elektroporation) in Bakterien (*E. coli* oder *S. typhimurium*) überführt. Hierfür wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit der zu transferierenden DNA in einer Elektroporationsküvette gemischt. Die Transformation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 μ F. Danach wurden die Zellen in 800 ml LB-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37°C auf

einem Schüttler bei 800 rpm inkubiert. Abschließend wurde 50 µl Bakterien auf Selektivagarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Inkubator kultiviert.

3.7.11 Kontrolle der Klonierung

Zur Kontrolle der Klonierung und der positiven Klone nach der Transformation wurde ein Restriktionsverdau mit einem bestimmten Restriktionsenzym durchgeführt und der Verdau auf einem Agarosegel analysiert. Die dort zu sehenden Banden lieferten eine eindeutige Aussage über den Erfolg der vorangegangenen Klonierung. Als alternative Methode zur Überprüfung der Klonierung wurde eine Bakterien-PCR durchgeführt. Dazu wurde ein (vermeintlich) positiver Klon von der Platte gepickt, im PCR-Ansatz resuspendiert und eine PCR durchgeführt. Durch Wahl geeigneter Primer wurde sichergestellt, dass die Klonierung erfolgreich war und das Gen auch in der richtigen Orientierung in das Plasmid integriert wurde.

3.8 Arbeiten mit Proteinen

3.8.1 SDS-PAGE

Die Trennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichtes erfolgt in der Molekularbiologie mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (125). Die Auftrennung erfolgt in einem elektrischen Feld. Das Gel setzt sich zusammen aus dem Monomer Acrylamid, TEMED (N,N,N'-Tetramethyletylendiamid) und Ammoniumpersulfat (APS). Diese Substanzen werden durch die Zugabe von Bisacrylamid miteinander quervernetzt. Das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bestimmt den Vernetzungsgrad des Gels. SDS, wird dem Gel und dem Probenpuffer zugesetzt, bindet an die Polypeptidketten der Proteine und verleiht diesen eine negative Nettoladung. Vor dem Auftragen auf das Gel werden die Proteinproben bei 90 °C denaturiert, was zum Auflösen der Konformation führt, wodurch die Proteine in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld zur Anode wandern. Das Polyacrylamidgel besteht aus dem unten liegenden Trenngel, in dem die Proteine gemäß ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden, und dem darüber liegenden Sammelgel. Darin

befinden sich die Geltaschen zur Ladung der Proteinproben. Im Sammelgel findet eine Konzentrierung der Proben an der Grenze zum Trenngel statt. Standardmäßig wurden 10%-ige Trenngele und 5%-ige Sammelgele aus einer 30% (V/V) Acrylamidstammlösung hergestellt und verwendet.

Zu Beginn wurden zwei Glasplatten mit Spacern voneinander abgetrennt und mit Klammern in eine Gießapparatur eingespannt, das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und dann mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und mit einem Taschenkamm versehen. Nach dem Erhärten des Sammelgels wurde der Kamm durch vorsichtiges Herausziehen entfernt und die Geltaschen mit H2O ausgespült, um Acrylamidreste zu beseitigen. Daraufhin wurde das Gel in eine Gelkammer von BioRad eingesetzt. Vor dem Einfüllen der Proben in die Geltaschen mit einer Gilson-Pipette wurden sie im Verhältnis 1:5 mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 90°C denaturiert. Der Gellauf wurde in 1 x Laemmli-Puffer bei einer konstanten Spannung von 200 V für ca. 2 h durchgeführt. Durch die Verwendung von Proteinmarkern ist es möglich, nach Färbung des Gels bzw. des Immunoblots die gebildeten Banden entsprechend ihres Molekulargewichtes zuzuordnen.

3.8.2 Immunblot (Western Blot)

Towbin und Kollegen (126) entwickelten 1979 eine Technik, um Proteine nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE in einem elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Transfermembran zu übertragen und zu immobilisieren. Diese Technik ist bekannt unter dem Namen Immunblot oder Western Blot. Vor dem Blotten wurden das Gel und die Transfermembran kurz in Transferpuffer äquilibriert und dann luftblasenfrei zwischen zwei Transferpuffer-getränkte Schwämme und zwei Lagen Gel-Blot-Papier gelegt. Dieser stapelmäßige Aufbau wurde durch eine Plastikhalterung von beiden Seiten fixiert und in eine Tankblot-Kammer eingesetzt, in der sich bereits Western-Transfer-Puffer befand. Der Proteintransfer wurde bei 90V für 1 h durchgeführt. Die Elektroden wurden dabei so an das Stromgerät angeschlossen, dass der Stromfluss dabei von der Kathode durch das Gel und die Membran zur Anode verlief. Dadurch wurden die Proteine vom Gel auf die Membran transferiert, immobilisiert und konnten anschließend mittels spezifischer Antikörper untersucht und analysiert werden. Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in 5 % (M/V) Milchpulver in PBS bei RT für 1 h inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem ersten Antikörper, einem polyklonalen Antikörper (anti-YopE) gegen die Fusionsproteine gerichtet, erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem horizontalen Schüttler. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 10 min bei RT mit Waschpuffer (PBS mit 0,5 % (M/V) BSA) entfernt. Im Anschluss wurde die Membran für 1 h mit einem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper inkubiert, der gegen den primären Antikörper gerichtet war. Die Antikörper wurden in 0,5% (M/V) Milchpulver in PBS verdünnt (1:5000).

Auf die Inkubation mit dem sekundären Antikörper folgte zweimaliges Waschen der Membran für 10 min mit 0,5% (M/V) Milchpulver in PBST. Zum Schluss wurde die Membran ausschließlich mit PBST gewaschen. Durch die Inkubation in einem 1:1 Gemisch einer Chemilumineszenz-Lösung (WestPico Luminol/Enhancer und WestPico Stable Peroxid) für ca. 2 min wurde die "horse radish-peroxidase" (HRP, Peroxidase) aktiviert. Danach wurde die Membran luftblasenfrei mit einer Plastikfolie bedeckt, ein Röntgenfilm aufgelegt, für 5 -30 min exponiert, entwickelt und fixiert.

3.9 Zellkultur

3.9.1 Auftauen von Zellen

Kryoröhrchen mit einer Zellsuspension von 1 bis 2 x 10⁶ Zellen/ml wurden aus dem flüssigen Stickstofftank genommen und umgehend in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt, um ein zügiges Auftauen der Zellen zu gewährleisten. Nach Auftauen der Suspension wurde diese mit einer Pipette in 9 ml vorgewärmtes Nährmedium überführt und die Zellen ein Mal bei 1400 rpm, 5 min abzentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde abgenommen, die Zellen wurden in 10 ml Nährmedium resuspendiert und in eine mittlere Zellkulturflasche (260 ml) überführt. Die jeweiligen Zellen wurden unter den spezifischen Kulturbedingungen inkubiert, bis die Zellen einen konfluenten Monolayer bildeten. Nach zweimaligem Passagieren der Zellen wurden diese erstmals für weiterführende Versuche eingesetzt.

3.9.2 Zellkulturbedingungen und Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (260 ml bzw. 800 ml) in Standard-Zellkulturmedium bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Sobald die adhärenten Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie gesplittet und auf diese Weise weitergeführt. Hierzu wurde das Zellmedium abgesaugt und 5 ml Trypsin/EDTA Lösung zugegeben, damit sich die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschale ablösen. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Standard-Zellkulturmedium abgestoppt, die Zellsuspension bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 3 ml Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde 1:10 verdünnt in einer neuen Zellkulturflasche weiterkultiviert.

3.9.3 Einfrieren von Zellen

Für spätere Anwendungen wurden Zellen eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Einfriermedium für Zellen wurde steril filtriert und auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden durch Trypsinieren von der Zellkulturflasche abgelöst, vereinigt und bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde tropfenweise in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und sofort in vorgekühlte 1 ml Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden bis zu 24 h bei -20°C gelagert und anschließend bis zu sechs Monaten bei -80°C oder -192°C (flüssiger Stickstoff) konserviert.

3.10 Immunologische Methoden

3.10.1 Histologie und Immunhistochemie

Zur genauen Analyse der Tumorvakzinierung wurden die Flankentumore histologisch und immunhistochemisch untersucht.

3.10.1.1 Einbettung der Organe

Nach der Entnahme des Tumors aus der Flanke der Maus wurde dieser von umliegendem Fettund Bindegewebe befreit und für 24 h in frisch hergestelltem PLP-Medium fixiert. Anschließend wurde der Tumor zweimal mit P-Puffer gewaschen und über Nacht in 30% Saccharose (in P-Puffer) inkubiert. Nach dieser Fixierungsprozedur wurden die Tumore mit TissueTek Medium in Plastikschälchen eingebettet und sofort auf Trockeneis tiefgefroren. Die eingebetteten Tumore wurden bis zum Schneiden bei -80°C gelagert.

3.10.1.2 Schneiden der eingebetteten Organe

Die tief gefrorenen, eingebetteten Organe (Tumore) wurden mit einem Kryotom in 8 bis 10 µm dicke Schnitte prozessiert. Dazu ließ man die eingebetteten Organe im Kryotom auf -30°C erwärmen, spannte das Präparat in die Schneidevorrichtung ein und transferierte die Schnitte auf einen Objektträger. Die Schnitte wurden für 24 h bei 4°C gelagert und anschließend gefärbt.

3.10.1.3 HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wird in der Histologie verwendet, um verschiedene Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild anhand von zwei verschiedenen Einzelfärbungen zu untersuchen. Sie fungiert auch als Übersichtsfärbung. Zur Durchführung wurden die Kryoschnitte je 2 min in einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 80%, 50%) fixiert, anschließend kurz mit destilliertem Wasser gespült und für 6 min in Hämatoxylin gefärbt. Nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser erfolgte das Bläuen der Schnitte für 15 min unter fließendem Leitungswasser. Danach wurden die Schnitte mit 1% Eosin für 30 Sekunden gefärbt, wieder gespült und mit Kaisers Glycerin Gelatine und einem Deckglas eingedeckelt und versiegelt. Zellkerne erscheinen blau und das Zytoplasma und die extrazelluläre Matrix rot. Die HE-Färbungen wurden im Leica Fluoreszenzmikrsoskop im Hellfeld-Modus untersucht und mittels einer Kamera Ausschnitte davon in 10facher Vergrößerung fotografiert. In der HE-Färbung werden saure Moleküle wie Kerne, saure Schleimsubstanzen, Bakterien und Kalk durch das Hämatoxylin dargestellt, sodass sie blau erscheinen. Eine leichte Rotfärbung ist zu sehen beim Zytoplasma der Zellen, bei Kollagen und proteinhaltigen Lösungen. Die Datenprozessierung erfolgte mit der Meta Imaging Series 6.1 Software (Meta Morph).

3.10.1.4 Färbung des Bindegewebes

Zur Anfärbung des Bindegewebes bzw. der elastischen Fasern in Tumoren wurde eine Resorcin-Fuchsin-Färbung gefolgt von einer Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminium-Lösung durchgeführt. Hierzu wurden die Kryoschnitte der Tumore mit einer absteigenden Alkoholreihe behandelt und anschließend für 40 min in einer Resorcin-Fuchsin-Lösung inkubiert. Die Schnitte wurden danach mit destilliertem Wasser abgespült und mit HCl-Alkohol differenziert bis der Untergrund klar war und die elastischen Fasern deutlich erschienen, woraufhin mit Leitungswasser 15 min gewaschen wurde. Als Nächstes folgte die Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminium-Lösung für 6 min mit anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser. Zuletzt wurden die Objekträger mit Kaisers Glycerin Gelatine eingedeckelt und versiegelt. Bei dieser Färbung sollen Zellkerne rot, elastische Fasern tiefbraun (manchmal auch blau violett), kollagene Fasern rosa und Muskelfasern rötlich erscheinen. Die Bindegewebs-Färbungen wurden im Leica Fluoreszenzmikrsoskop im Hellfeld-Modus untersucht und mit der Meta Imaging Series 6.1 Software (Meta Morph) bearbeitet.

3.10.1.5 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten

Die Kryoschnitte wurden zuerst für 10 min mit kaltem Aceton in einer Färbeküvette fixiert, zweimal in 1xPBS gewaschen und danach für 1h bei RT in PBS mit 10% BSA blockiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit dem CD31-FITC Antikörper in der Konzentration 1:300 für 1h im Dunkeln gefärbt. Die Verdünnung des Antikörpers erfolgte in einer Lösung aus PBS mit 1% BSA und 0,25% Triton X-100. Die Schnitte wurden nach dieser ersten Färbung wieder zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit DAPI (1:2500 in PBS mit 1% BSA und 0,25% Triton X-100) für 2 min inkubiert und erneut gewaschen. Abschließend erfolgte das Eindeckeln der Schnitte mit Mowiol.

3.10.1.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die mittels immunfluoreszenter Antikörper gefärbten Kryoschnitte der Tumore oder anderer Gewebe wurden im Olympus BX61 Immunfluoreszenzmikroskop untersucht und mit Hilfe einer OCC Olympus Kamera und der Software Cell^P fotografiert und im Detail analysiert. Zur Messung der Fluoreszenzintensität der CD31-FITC-Färbung wurde das Phasenanalyse-Programm und die Partikeldetektion der Cell^P Software von Olympus verwendet. Gegebenenfalls wurden die Bilder auch mit Photoshop bearbeitet.

3.10.2 Durchflusszytometrie (FACS)

3.10.2.1 Lymphozytenanreicherung aus der Milz

Nach dem Töten durch CO₂ wurde die Maus per seitlichem Rückenschnitt geöffnet, die Milz heraus präpariert und in 3 ml RPMI 1640-Medium gelagert. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Milz mit dem Stempel einer Injektionsspritze über einem Zellsieb zerkleinert und abermals in RPMI 1640-Medium aufgenommen. Danach wurden die Zellen für 7 min bei 4°C mit 1500 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die sich im Pellet befindlichen Zellen in dem kleinen verbliebenen restlichen Überstand gelöst. Daraufhin wurde die Zellsuspension durch Zugabe von 5 ml ACT für 7 min bei RT einer Erythrozytenlyse unterzogen. Diese Reaktion wurde durch eine 1:1 Verdünnung mit RPMI 1640- Medium abgestoppt und die Zellen bei 1500 rpm für 7 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den lysierten Erythrozyten wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml RPMI 1640-Medium aufgenommen, durch eine Nylonmembran gefiltert und anschließend die Zellzahl ermittelt.

3.10.2.2 Lymphozytenanreicherung aus Tumoren

Nach dem Töten der Maus durch CO₂ wurde der subkutane Melanom-Tumor von der Flanke der Maus entfernt und in 3 ml RPMI 1640-Medium gegeben. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde der Tumor mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und für 40 min auf einem Magnetrührer in PBS + 2mM EDTA geschüttelt. Anschließend wurden 2 mg Kollagenase zugegeben und für weitere 2 h geschüttelt. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Tumorstücke weiter homogenisiert und danach mit dem Stempel einer Injektionsspritze über einem Zellsieb zerkleinert und erneut in RPMI 1640-Medium aufgenommen. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie bei der Lymphozytenanreicherung aus der Milz (s. 3.10.2.1).

3.10.2.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierfür wurde die Zellsuspension 1:20 in Trypanblau- Lösung verdünnt, 10µl der Verdünnung in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die nicht- angefärbten Zellen gezählt. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel ermittelt:

Gesamtzellzahl = Zellzahl x Volumen der Zellsupension x Verdünnungsfaktor x 10^4

3.10.2.4 Immunfluoreszenzfärbung von Milzzellen

Zur Analyse der aufgereinigten Lymphozyten wurden diese nach der angegebenen Zeit nach der Immunisierung mit verschiedenen Salmonellenstämmen mit diversen Oberflächenmolekülen angefärbt. Es wurden Färbungen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker durchgeführt. Die Färbungen wurden mit $6x10^6$ der aufbereiteten Zellen aus den jeweiligen Organen in 96-well Platten auf Eis durchgeführt.

Um den Fc γ -Rezeptor zu blockieren, wurden die Zellen zuerst mit anti-CD16/CD32 (Fc-Block) in einem Volumen von 100 µl FACS- Puffer im Verhältnis 1:100 20 min unter einer Lampe auf Eis inkubiert. Gleichzeitig wurde dem Ansatz EMA (2 mg/ml DPBS) im Verhältnis 1:1000 zugegeben, um tote Zellen ausschließen zu können. EMA diffundiert in tote Zellen und interkaliert in die DNA. Unter Lichteinfluss bindet EMA kovalent an die DNA. Im Durchflusszytometer können dadurch tote Zellen detektiert und bei der Analyse aus der Messung ausgeschlossen werden. Nach dem Blockieren der Fc γ -Rezeptoren und der Lebend/Tot-Färbung erfolgte ein Waschritt, bei dem 150 µl FACS-Puffer auf die Zellen pipettiert wurden, 2 min bei 1500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Die

Oberflächenmarkierung der Zellen mit verschiedenen Antikörpern (s. Tab. 9) erfolgte daraufhin in einem Volumen von 50 µl FACS- Puffer für 20 min auf Eis im Dunkeln in der 96-well-Platte. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und in 350 µl FACS- Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden mit 1 % PFA fixiert, falls sie vor der Messung am Durchflusszytometer über Nacht bei 4°C gelagert wurden.

Die Tetramerfärbung (KDR2-Tetramer) wurde wie die Markierung von Oberflächenmolekülen durchgeführt. Dabei wurde das Tetramer 1:50 eingesetzt und zusammen mit den Oberflächenmarkern für 1 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Normalerweise wurde die Färbung mit folgenden Mengen und Antikörpern durchgeführt: 0,5 μ l CD8 APC eFluor780, 0,5 μ l CD62L FITC, 1 μ l CD127 APC, 1 μ l Tetramer KDR2 PE pro Probe in einem Volumen von 50 μ l.

Alle anderen Arbeitsschritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

3.10.2.5 FACS-Analyse

In einem Durchflusszytometer ("fluorescence activated cell sorter", FACS) kann die Größe, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität von Zellen gemessen und unterschieden werden (127).

Dazu werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wobei beim Passieren jeder einzelnen Zelle das Licht gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht ("forward light scatter", FSC) ist das Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht ("side scatter", SSC) das Maß für die Granularität einer Zelle.

Um Zellen außer in ihrer Größe und Granularität unterscheiden zu können, wurden sie mit verschiedenen Fluorochromen angefärbt. Fluorochrome absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch sogenannte "Photomultiplier" (Detektoren) des FACS in elektrische Signale umgewandelt. Dadurch erhält man Informationen über die Anzahl der fluoreszierenden Zellen, sowie deren Fluoreszenzintensität. Die Farbstoffe, die als Oberflächenmarker zur Färbung der Zellen benutzt wurden, haben unterschiedliche Emissionsspektra, die in verschiedenen Kanälen gemessen werden.

In der Regel kamen folgende Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz (in Klammern steht die Abkürzung und die maximale Emission): Die mit dem blauen Laser angeregten Farbstoffe Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC, 519 nm) und Phycoerythrin (PE, 578 nm) sowie die mit dem roten Laser angeregten Farbstoffe Allophycocyanin (APC, 660 nm) und APC Alexa

Fluor750 (750 nm) bzw. APC eFluor 780 (780 nm). Zur Kompensierung der Oberflächenmarker wurden die Antikörper CD8a-APC, CD8a-FITC, CD4-PE, CD4-PerCP, CD8-APC Alexa Fluor 750 und CD8 eFluor 780 (alle Natutec, Frankfurt) eingesetzt.

Die Durchflusszytometrie wurde mit dem *BD FACSCantoTM II Flow Cytometry System* mit der *BD FACSDivaTM Software* (BD, Heidelberg) durchgeführt.

3.10.2.6 Auswertung der FACS-Daten mit FlowJo Software

Die Analyse der bei der FACS-Messung generierten Daten erfolgte mit Hilfe der *FlOWJO Flow Cytometry Analysis Software* (Tree Star, Ashland). FlowJo ist ein Analyseprogramm für die wissenschaftliche Auswertung durch Durchflusszytometrie generierter Daten. Es beinhaltet Werkzeuge zur Handhabung immunphänotypischer Datenanalysen. Außerdem besitzt es weitere Datenanalyseplattformen wie statistischer Vergleich von Proben, Kalibrierung (Quantifizierung), und Kompensation. Eine "Clustering"-Plattform erlaubt das automatische Auffinden von Zellsubpopulationen und eine Multigraphoverlay-Plattform erleichtert die Visualisierung der erfassten Daten.

Die Analyse der gemessenen Zellen erfolgt in einem entsprechenden Computerprogramm über die Größe, Granularität und Fluoreszenzfarbstoffe. Dabei werden Zellpopulationen die aufgrund der vorher genannten Eigenschaften von Interesse sind mit sogenannten "*Gates*" eingegrenzt und im Detail betrachtet.

Zur Datenanalyse wurde außerdem die *GraphPad Prism Software* (GraphPad Software, La Jolla) verwendet.

3.11 Mausversuche

3.11.1 Mausstamm

C57Bl/6-Mäuse wurden von Harlan-Winkelmann (Borchen) oder Janvier (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich) bezogen und im Alter von sechs bis acht Wochen für Versuche verwendet. Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2Kb. Es handelt sich um einen Inzuchtstamm, d.h. jedes Tier ist nahezu homozygot und die Tiere haben demnach ein identisches genetisches Material mit Ausnahme einzelner spontaner Mutationen. Inzuchtmäuse bieten daher einen definierten und konstanten genetischen Hintergrund für *in vivo*-Analysen.
3.11.2 Haltung der Mäuse

Alle Mäuse wurden in dem Tierstall des Max von Pettenkofer-Instituts in München gemäß der geltenden Rechtsgrundlagen gehalten. Die Haltung erfolgte in Gruppen von bis zu fünf Tieren in individuell belüfteten Käfigen (Tecniplast, Buguggiate, Italien). Tierversuche wurden gemäß der geltenden Rechtsgrundlage der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsanträge 76-06 und 63-08) durchgeführt.

3.11.3 Organentnahme

Für die Durchführung immunologischer Untersuchungen wurden Lymphozyten aus der Milz und aus Melanom-Flankentumoren isoliert. Die Organentnahme erfolgte nach der im jeweiligen Experiment angegebenen Zeit. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse mit CO₂ getötet, äußerlich mit Ethanol (70 %) desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert. Als Vorlage für die korrekte Präparation diente folgende, frei zugängliche Webseite des "National Institute of Allergy and Infectious Diseases" (NIAID):

http://www3.niaid.nih.gov/labs/aboutlabs/cmb/InfectiousDiseasePathogenesisSection/mouseN ecropsy/

Genauere Erläuterungen zur Isolierung von Lymphozyten aus Milz bzw. Tumor wurden bereits bei der Beschreibung der Durchflusszytometrie (3.10.2.1) gemacht.

3.11.4 Orogastrische Infektion mit Salmonellen

Die Infektion mit verschiedenen Salmonellenstämmen erfolgte orogastrisch via Schlundsonde. 24 h vor der bakteriellen Infektion wurden die C57Bl/6 Mäuse mit dem Antibiotikum Streptomycin vorbehandelt. Dazu wurden 20 mg Streptomycin gelöst in PBS mit Hilfe einer Schlundsonde oral verabreicht (128). Die Salmonellen wurden wie in 3.1.4 beschrieben angezüchtet. Das Überimpfen der Übernachtkultur in LB-NaCl dient der Synthese der Effektorproteine des auf der SPI-1 kodierten T3SS, das durch die erhöhte Salzkonzentration im Medium aktiviert wird. Nach Wachstum der *Salmonella*-Kulturen bis zu einer OD600 von 0,6 bis 0,8 wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei RT mit 6000 rpm für 10 min vom Medium isoliert. Die Bakterienzellzahl pro 100 μ l wurde mit Hilfe der gemessenen OD-Standardkurve von *S. typhimurium* ermittelt (OD600 0,1 = 2,5 x 10⁸ Bakterien/ml). Durch Entfernen von Futter und Wasser ca. 4 h vor der Immunisierung wurden die Mäuse nüchtern gesetzt und dadurch Magen und Darm teilweise entleert. Die Immunisierung der Mäuse wurde mit Hilfe einer Schlundsonde durchgeführt, wobei jeder Maus eine Dosis von 5 x 10⁸ Bakterien in einem Volumen von 100 μ l verabreicht wurde. Im Anschluss wurde den Tieren wieder Futter und Wasser gegeben. Die Gesamtkeimzahl des Inokulums wurde zur Kontrolle bestimmt, indem eine Verdünnungsreihe auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert wurde.

3.11.5 Kolonisierungskinetik der Salmonelleninfektion

Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion mit Salmonellen wurden die Mäuse mit CO₂ getötet, äußerlich mit Ethanol (70 %) desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert. Daraufhin wurde die Maus per Bauchschnitt geöffnet und Milz, Peyersche Plaques (PP), mesenteriale Lymphknoten (MLN), Dünndarm ("small intestine", SI) und Leber entfernt. Diese Organe wurden in 500 µl sterilem PBS aufgenommen und entweder zusammen mit zwei Metallkugeln in einem Homogenisator zerkleinert oder per Hand in einem Glaszylinder mit einem Glasstempel homogenisiert. Die automatische Homogenisation erfolgte bei Amplitude 80 für 5 min. Das Resultat dieser Zerkleinerung der Organe war die Zerstörung der Zellen und die Freisetzung der Bakterien. Die entstandene Zellsuspension wurde seriell in sterilem PBS verdünnt und jeweils 100 µl von verschiedenen Verdünnungsstufen auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten ausgezählt und statistisch ausgewertet.

3.11.6 Kombinations-Immunisierung mit Salmonellen und CpG sowie Peptid

Beim Versuch, die KDR2-spezifische CD8⁺T-Zellantwort zu erhöhen, wurden CpG-Oligonukleotide ("ODN 1826", Cayla InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich) in Kombination mit KDR2-Peptid (Biosyntan, Berlin) als stimulierendes Agens verwendet. Eine Woche nach der orogastrischen Infektion mit Salmonellen wurde den Mäusen subkutan 100 µg CpG-Oligonukleotide zusammen mit 50 µg KDR2-Peptid (Aminosäuresequenz VILTNPISM) in einem Gesamtvolumen von 150 µl verabreicht. Dazu wurde die Maus an der Flanke rasiert, mit Isofluran kurz betäubt und die Mixtur aus CpG und Peptid unter die Haut der Maus gespritzt. Der Erfolg dieser Kombinations-Immunisierung wurde durch Messung der KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellantwort mittels Tetramerfärbung und FACS-Analyse überprüft.

3.11.7 Flankentumormodell

Bei der B16-Tag-Tumorzelllinie handelt es sich um eine für das Large T Antigen transgene B16-Melanomzelllinie im C57Bl/6 Hintergrund. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Standard-Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ in 800 ml Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst, in Medium aufgenommen, bei 800 g für 5 min abzentrifugiert und erneut in 5 ml frischem Medium resupendiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (s. 3.10.2.2) und nach abermaligem Zentrifugieren konnte die Konzentration der Melanomzellen auf 3 x 10⁵/100 µl Medium eingestellt werden. Zum Setzen eines Tumors wurden 100 µl pro Maus subkutan in die Flanke injiziert.

3.11.8 Künstliches Lungenmetastasierungsmodell

B16F10-Mausmelanomzellen stellen ein gängiges Metastasierungsmodell in Mäusen dar (129). Die Melanomzellen werden intravenös in die Schwanzvene verabreicht und gelangen über die Blutbahn und die Lymphbahnen in die Lunge, wo sie adhärieren und Lungenmetastasen bilden. Die Tumorzellen werden wie beim Flankentumormodell beschrieben kultiviert und vorbereitet. Die Dosis für das i.v.-Metastasierungsmodell beträgt 2 x 10^5 Zellen in einem Volumen von 100 µl. Die C57Bl/6 Mäuse werden für ca. 10 min unter einer Rotlichtlampe schonend erwärmt, sodass die Schwanzvene besser zu erkennen ist und die Tumorzellen durch eine Spritze mit Kanüle injiziert werden können. Dieses Tumormodell ist für Experimente bis zu einer Dauer von ca. 14 Tagen angelegt. Danach wurden die Mäuse mittels CO₂ getötet, die Lungen herauspräpariert, makroskopisch untersucht und mittels einer Digitalkamera fotografiert. Die Auswertung dieses Tumorexperiments erfolgte durch Zählen der Lungenmetastasen bzw. durch Bestimmung der durch Lungenmetastasen bedeckten Lungenfläche mit Hilfe der Photoshop Software.

3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit Hilfe des nicht-parametrischen "Mann-Whitney-U-Tests" oder des "Student t"-Tests auf dem 0,05 Signifikanzniveau.

4.1 Klonierung einer Genfusion zur Synthese eines Salmonellen SPI-1-VEGFR2 Hybridproteins

Um das Ziel der Salmonellen-vermittelten Vakzinierung gegen VEFGR2 zu verfolgen, mussten zuerst mehrere Konstrukte auf DNA-Ebene hergestellt werden. Die molekulare Klonierung der verschiedenen Konstrukte erfolgte in *E. coli* und die fertigen Plasmide wurden jeweils in den Salmonellenstamm *S. typhimurium* SB824 bzw. *S. dublin* BRD620 transformiert. SB824 ist ein attenuierter *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) Stamm, der Mutationen in den Genen *aroA* und *sptP* aufweist. *S. dublin* BRD620 ist in den Genen *aroA* und *aroD* mutiert. Basierend auf der neuartigen Salmonellen-T3SS-vermittelten oralen Vakzinierungsstrategie (38) wurde eine Genfusion zur Synthese eines Hybridproteins aus der N-terminalen Translokationsdomäne des Yersinien-Effektorproteins YopE und verschiedenen immunogenen Epitopen des VEGFR2 hergestellt. Das 4191 bp große *flk-1* Gen kodiert für das 1367 AS lange murine VEGFR2-Protein, in dessen extrazellulärer Domäne zwei immunogene Epitope (KDR2 und KDR3) von Khleif und Kollegen identifiziert wurden (80). Bei der neuartigen Vakzinierungsstrategie wird das T3SS auf der SPI 1 von Salmonellen dazu verwendet, um Antigene direkt in das Zytosol von beispielsweise Antigen präsentierenden Zellen (APC) zu translozieren.

YopE ("*Yersinia* outer protein E") ist ein T3SS Effektorprotein aus Yersinien und fungiert als Träger eines translational fusionierten Proteins. Dieses Hybridprotein wird dadurch direkt in das Zytosol der Zielzelle (z.B. Makrophagen und dendritische Zellen) transloziert. Die aminoterminalen 138 AS von YopE, die die Translokationsdomäne beinhalten, sind ausreichend für die Translokation von Fremdproteinen. Die vielfältigen Eigenschaften von YopE als Trägerprotein für heterologen Antigentransport durch Salmonellen wurden in mehreren Veröffentlichungen gezeigt (37;39;47;130;131).

Der Basisvektor für die Klonierung ist ein pWSK29-Derivat und enthält die genetische Information für das Yersinien Chaperon SycE und das Yersinien Effektorprotein YopE₁₋₁₃₈. In diesen Vektor wurden Fragmente des murinen VEGFR2 Gens (KDR2, KDR3, ec) kloniert, so dass eine translationale Fusion aus dem Chaperon SycE, dem Effektorprotein YopE₁₋₁₃₈ und den verschiedenen Fragmenten von VEGFR2 entsteht.

Das Plasmid pHR580 beinhaltet den extrazellulären Teil (ec) von VEGFR2, pHR583 trägt die genetische Information für KDR3 und pHR584 für KDR2 (siehe Abb. 8). Die immunogenen Epitope KDR2 bzw. KDR3 befinden sich in den Ig-ähnlichen Domänen 4 (AS 352-411) bzw. 6 (AS 552-651) des VEGFR2 Proteins. Die Plasmide pHR583 und pHR584 haben zusätzlich zu den Epitopsequenzen noch kleine flankierende Bereiche am 5'- und am 3'- Ende. KDR2 und KDR3 sind H-2D^b-spezifische CD8⁺T-Zell-Epitope mit den Aminosäuresequenzen VILTNPISM bzw. FSNSTNDILI. Die drei Plasmidkonstrukte besitzen jeweils einen *lac*-Promotor, der für eine konstitutive Expression der Hybridproteine in Salmonellen sorgt.



Abb. 8 Schema der translationalen Proteinfusion von YopE mit VEGFR2. Rechts ist das murine Transmembranprotein VEGFR2 dargestellt. Die exrazellulären Ig-ähnlichen Domänen sind von 1 bis 7 durchnummeriert in roten Kreisen zu sehen. Die Transmembrandomäne ist in gelb dargestellt und die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne in grün. Links: Durch molekulares Klonieren ist die Aminoterminale Translokationsdomäne von YopE (AS 1-138) fusioniert mit der gesamten extrazellulären Domäne des murinen VEGFR2 (a), mit der extrazellulären Ig-ähnlichen Domäne 6 (AS 552-651) (b) oder mit der Domäne 4 (AS 352-411) (c). Das Plasmid pHR580 (a) enthält sowohl das CD8-Epitop KDR2 als auch KDR3, das Plasmid pHR583 (b) mit der Domäne 6 enthält das CD8-Epitop KDR3 und das Plasmid pHR584 (c) das CD8-Epitop KDR2. Die Expression der Genfusionen auf den Plasmiden erfolgt unter der Kontrolle des P_{lac} Promotors, der in *Salmonella* konstitutiv aktiv ist.

4.2 Synthese des Hybridproteins mittels T3SS der Salmonellen

Das Hybridprotein, das aus der N-terminalen Translokationsdomäne des Effektorproteins YopE und KDR2, KDR3 oder ec besteht, wird von den Salmonellen synthetisiert und über deren T3SS, das auf der SPI-1 kodiert ist, mit Hilfe des Chaperons SycE theoretisch in das Zytosol der Wirtszelle transloziert. Nach der Invasion der Zielzelle verbleiben Salmonellen in einem Makropinosom bzw. einer Vakuole (SCV, *"Salmonella* containing vacuole"). Durch die Aktivierung des T3SS wird die Translokation der Hybridproteine und anderer Salmonellen-Effektorproteine durch die nadelförmige Struktur des T3SS in das Zytosol der Wirtszelle induziert (siehe Abb. 9). Es wurde bereits vielfach gezeigt, dass YopE-Fusionsproteine in das Zytosol von Wirtszellen transloziert werden (22;39).



Abb. 9 T3SS-abhängige Translokation von Hybridproteinen. Nach der Invasion der Wirtszelle befinden sich die Salmonellen in einem Makropinosom und translozieren die Hybridproteine mit Hilfe des T3SS in das Zytosol der Wirtszelle.

Diese Eigenschaft wurde durch Proteinsyntheseexperimente nachgewiesen. Dabei diente die Sekretion der Fusionsproteine in den Überstand der Bakterienkultur als "Readout" für die intrazelluläre Translokation in das Zytosol der Wirtszelle. Eine Übernachtkultur des jeweiligen Salmonellenstamms mit den Plasmiden pHR580, pHR583 oder pHR584 wurde mit LB-NaCl verdünnt und für ca. 4 Stunden weiter geschüttelt. Hyperosmolarität im Nährmedium induziert das T3SS, wodurch das Hybridprotein synthetisiert und in den Überstand (Nährmedium) sekretiert wurde. Der immunologische Nachweis erfolgte mit Western Blot-Analysen, bei denen das jeweilige Hybridprotein mittels eines Antikörpers, der gegen das Trägermolekül YopE gerichtet war, detektiert wurde. Als Kontrolle diente das

Hybridprotein YopE-p60, das in der Literatur intensiv beschrieben wurde (39;132;133). p60 ist ein immunodominantes Antigen aus *Listeria monocytogenes* (134).

Wie in Abb. 10 durch die jeweiligen Proteinbanden im Western Blot (WB) zu sehen, wurden die Hybridproteine YopE₁₋₁₃₈–KDR2 (kodiert auf dem Plasmid pHR584) und YopE₁₋₁₃₈–KDR3 (kodiert auf dem Plasmid pHR583) von den Salmonellen synthetisiert (Ganzzelllysat) und aus der Bakterienzelle in den Überstand der Kultur sekretiert (Überstand). Die YopE-Fusionsproteine wurden immunologisch durch einen polyklonalen anti-YopE-Antikörper im Western Blot nachgewiesen.



Abb. 10 T3SS-vermittelte Expression der YopE-VEGFR2 Hybridproteine. In Western Blots aus den Proteinen des Überstands der Bakterienkultur wurden mit Hilfe eines Anti-YopE-Antikörpers die Hybridproteine YopE₁₋₁₃₈–KDR3 und YopE₁₋₁₃₈–KDR2 im Ganzzelllysat und im Überstand (siehe Pfeil) detektiert. YopE₁₋₁₃₈–KDR3 hat ein Molekulargewicht von 30 kDa und YopE₁₋₁₃₈–KDR2 von 32 kDa. Als Kontrolle wurde das Hybridprotein YopE-p60 verwendet, das ein Molekulargewicht von 72 kDa aufweist.

Das Hybridprotein YopE₁₋₁₃₈–KDR2 hat ein Molekulargewicht von 30 kDa und YopE₁₋₁₃₈– KDR3 von 32 kDa, was anhand von Proteingrößen-Standardmarkern festgestellt wurde. Das molekulare Gewicht des als Kontrolle aufgetragenen Hybridproteins YopE₁₋₁₃₈–p60 beträgt 72 kDa. Das größte genetische Konstrukt, YopE₁₋₁₃₈-ec, das den gesamten extrazellulären Bereich von VEGFR2 und somit beide immunogenen Epitope (KDR2 und KDR3) enthält, wurde nicht von den Salmonellen synthetisiert und auch nicht sekretiert, da weder aus dem Überstand noch aus dem Bakterien-Gesamtzelllysat, d.h. dem intrazellulären Lysat der Bakterienzellen, ein Protein im Western Blot mit dem Anti-YopE-Antikörper nachzuweisen war (Western Blot nicht gezeigt).

Im Vergleich der durch molekulares Klonieren neu hergestellten Hybridproteine YopE₁₋₁₃₈– KDR2 und YopE₁₋₁₃₈–KDR3 konnte im Western Blot nachgewiesen werden, dass die Syntheseeffizienz von YopE₁₋₁₃₈–KDR2 stärker war. Die Effizienz der Synthese von YopE₁₋₁₃₈–p60 ist vergleichbar mit YopE₁₋₁₃₈–KDR2.

4.3 Wachstumskurve der rekombinanten Salmonellen

Bakterien zeigen unter optimalen Bedingungen ein exponentielles Wachstum. Die typische Wachstumskurve von Bakterien gliedert sich in eine Anlauf- (lag-) phase, eine exponentielle (log-) Wachstumsphase, eine stationäre Phase und eine Absterbephase. Die Bakterien durchlaufen nach dem Animpfen des Nährmediums zuerst eine Anpassungsphase an die neuen Lebensbedingungen. Die Bakteriendichte ist gering, das Nährstoffangebot für die Mikroorganismen ist ausreichend, um sich zu vermehren und es erfolgt keine gegenseitige Hemmung durch Ausscheidungsprodukte. Als Nächstes kann man eine exponentielle Phase des bakteriellen Wachstums feststellen, in der sich jedes Bakterium ca. alle 20 min teilt. Wenn die Populationsdichte einen bestimmten Wert erreicht hat, wird das Nahrungsangebot knapp und ist lokal nicht mehr ausreichend. Die Ausscheidungsprodukte führen dann zum Tod von Bakterien und eine Gleichgewichtsphase stellt sich ein, in der genauso viele Bakterien sterben wie auch neue entstehen. Abschließend lässt sich eine Absterbephase feststellen, wenn das Nahrungsangebot nicht mehr ausreicht und die Ausscheidungsprodukte Überhand nehmen. Es sterben dann mehr Bakterien ab als neue gebildet werden.

Dieses typische bakterielle Wachstumsverhalten trifft auch auf die rekombinanten Salmonellen der Serovare Typhimurium und Dublin zu, die die neu konstruierten Plasmide pHR583 und pHR584 tragen. Stellvertretend ist die Wachstumskurve von *S. typhimurium* SB824 (pHR584) dargestellt (siehe Abb. 11). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Verdünnen der Übernachtkultur in LB-NaCl Medium wurde die optische Dichte bei 600 nm gemessen, Verdünnungen der Kultur auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und diese über

Nacht bei 37°C inkubiert, um die jeweilige Bakterienzahl zu ermitteln. Die Dauer vom Verdünnen der Übernachtkultur (1:20) bis zum Erreichen der stationären Phase beträgt ca. 2 h. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Das bakterielle Wachstum von *S. typhimurium* SB824 (pHR584) zeigt eine langsame Anlaufphase, in der sich die Mikroorganismen nur mäßig teilen und die Anzahl der Bakterien, die auf den selektiven Agarplatten ermittelt wurde, nur langsam ansteigt. In der darauffolgenden exponentiellen Phase, die etwa ab einer OD von 0,15 beginnt, teilen sich die Salmonellen im Durchschnitt alle 20 min und deshalb steigt die Bakterienzahl innerhalb relativ kurzer Zeit schnell an. Ab einer OD von ca. 1,0 beginnt die stationäre Wachstumsphase, in der Absterben von Bakterien und Teilung ein Gleichgewicht erreichen.



Abb. 11 Wachstumskurve von S. typhimurium SB824 (pHR584). Exemplarisch für S. typhimurium ist die Wachstumskurve für SB824 (pHR584) dargestellt. Das Wachstum zeigt den für Bakterien typischen Verlauf mit Anlaufphase, exponentiellem Wachstum und stationärer Phase. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Verdünnen der Übernachtkultur wurde während der Inkubation der Salmonellen bei 37°C die optische Dichte bestimmt. Zusätzlich wurde die jeweilige Bakterienprobe auf selektiven Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert, um die Bakterienanzahl zu bestimmen.

Das neu klonierte und per elektrischer Transformation in die Salmonellen gebrachte Plasmid pHR584 wirkt demnach nicht toxisch auf die Bakterien.

4.4 Infektion von C57Bl/6J Mäusen mit SB824 (pHR584) und Kinetik der Besiedelung verschiedener Organe

Salmonella enterica Serovar Typhimurium infiziert Mäuse normalerweise über den oralen Infektionsweg, d.h. die Bakterien werden beispielsweise mit der Nahrung über den Magen-Darm-Trakt aufgenommen, und breiten sich durch das Überqueren der Epithelschicht im Dünndarm von dort über den gesamten Organismus aus. Es gibt zahlreiche Tiermodelle, die systemische Infektionen mit Krankheitserregern beim Menschen simulieren sollen. Im Mausmodell stellt die systemische Besiedlung mit *S. typhimurium* die Typhuserkrankung im Menschen, die durch *S. typhi* verursacht wird, nach (4).

Hier sollte die Kolonisierung der neuartigen *S. typhimurium* SB824 (pHR584) im Mausmodell experimentell getestet werden. Dieser Salmonellenstamm wurde ausgewählt, weil im Vergleich zu SB824 (pHR583) im Western Blot eine größere Syntheseeffizienz des Fusionsproteins nachgewiesen werden konnte.

C57Bl/6J Mäuse wurden mit *S. typhimurium* SB824 (pHR584) orogastrisch, d.h. oral mit Schlundsonde infiziert und anschließend die Kinetik der Besiedlung verschiedener Organe mit diesen rekombinanten Salmonellen untersucht. Die Dosis betrug $5x10^8$ Bakterien und wurde anhand der oben gezeigten Wachstumskurve ermittelt. Nach der oralen Infektion gelangen Salmonellen über den Magen-Darm-Trakt in den Dünndarm und passieren dort meist über sog. M-Zellen die Epithelschicht und infizieren ihren Wirt systemisch.

Im Experiment wurden PP, MLN, Milz, SI und Leber auf die Kolonisierung mit Salmonellen hin untersucht. Die CFU ("colony forming units", Kolonie bildende Einheiten) pro Gramm wurden an Tag 2 (d2), Tag 6, Tag 14, Tag 21 und Tag 31 nach der Infektion mit Salmonellen bestimmt. Dazu wurden nach dem Töten der Mäuse durch CO₂-Begasung die jeweiligen Organe entnommen, in sterilem PBS homogenisiert und Verdünnungen auf selektiven Agarplatten ausgestrichen, um die Bakterienzahl durch Kultivierung über Nacht bei 37°C bestimmen zu können.

Wie in Abb. 12 dargestellt ist, kolonisieren die Salmonellen an Tag 2 neben dem Dünndarm auch bereits sehr stark die Milz mit CFU/g im Bereich von 10^6 bis 10^7 . Leber, MLN und PP sind ebenfalls bereits mit Salmonellen besiedelt; die CFU/g befinden sich für diese Organe an Tag 2 im Bereich von 10^4 . Nach sechs Tagen lassen sich überraschenderweise in den PP keine Salmonellen mehr finden. Erst nach 14 Tagen können dort wieder Salmonellen nachgewiesen werden.

Die Kolonisierung nimmt in der Leber und den mesenterialen Lymphknoten sukzessive ab. In der Milz und im Dünndarm nimmt die Salmonellendichte von Tag 2 nach Tag 6 drastisch ab, bleibt aber dann bis Tag 14 nahezu konstant, bevor an Tag 21 keine Bakterien mehr in diesen Organen nachzuweisen sind. Die längste Kolonisierungsdauer der Organe findet man in den MLN, aus denen bis Tag 31 nach der Infektion Salmonellen isoliert werden konnten.



Abb. 12 Infektion von C57Bl/6J Mäusen mit SB824 (pHR584) und Kinetik sowie Persistenz der Besiedelung verschiedener Organe. Peyer'sche Plaques (PP), mesenteriale Lymphknoten (MLN), Milz, Dünndarm (SI) und Leber wurden bis Tag 31 (Tag 31) nach der Infektion mit SB824 (pHR584) auf das Vorhandensein von Salmonellen untersucht. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Kolonie bildenden Einheiten (CFU) pro Gramm bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte von 5 Mäusen pro Zeitpunkt.

Neben der Bestimmung der CFU/g wurde auch das Aussehen der Organe beurteilt und auf eine mögliche Veränderung durch die Salmonellenkolonisierung geachtet. Eine deutliche Auswirkung der Organbesiedlung durch die Bakterien zeigte sich vor Allem in der Milz, die in den ersten zwei Wochen nach der Infektion mit Salmonellen vergrößert war im Gegensatz zu einer Milz aus einer nicht infizierten C57Bl/6 Maus. Bei den anderen Organen waren makroskopisch keine offensichtlichen Veränderungen auszumachen.

4.5 Kinetik der KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellantwort in der Maus nach oraler Immunisierung

CD8⁺T-Zellen haben eine entscheidende Funktion beim Lysieren und Abtöten von Zellen. Niethammer und Kollegen konnten mit Hilfe der DNA-Vakzinierung gegen VEGFR2 zeigen, dass CD8⁺T-Zellen für den Anti-Tumor-Effekt ihrer Impfstrategie verantwortlich sind, indem sie VEGFR2⁺ Endothelzellen gezielt angreifen und eliminieren (96). Dadurch wird die Angiogenese, also die Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen, gehemmt.

Aufbauend darauf sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die Salmonellen T3SSvermittelte Vakzinierungsstrategie gegen VEGFR2 spezifische CD8⁺T-Zellen generiert werden, die gegen ein immundominantes Epitop von VEGFR2 gerichtet sind. Die Analyse dieser spezifischen CD8⁺T-Zell-Antwort erfolgte über die neuartige Tetramertechnologie. Tetramere sind aus vier MHC-Molekülen und einem Antigen aufgebaut und erkennen hochspezifisch jene Epitope, die über MHC Klasse I-Moleküle auf CD8⁺T-Zellen präsentiert werden.

In dieser Arbeit wurden Tetramere verwendet, die die immunogenen Epitope KDR2 und KDR3 von VEGFR2 erkennen. C57Bl/6 Mäuse wurden oral mit SB824 (pHR584) bzw. SB824 (pHR583) immunisiert und anschließend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten eine Tetramerfärbung der murinen Milzzellen und eine FACS-Analyse durchgeführt, um KDR2bzw. KDR3-spezifische CD8⁺T-Zellen zu detektieren. Hierbei stellte sich heraus, dass die Immunisierung mit SB824 (pHR584) höhere spezifische CD8⁺T-Zellfrequenzen generiert als jene mit SB824 (pHR583) (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden die weiteren Experimente mit SB824 (pHR584) durchgeführt.

Um die Kinetik der Generierung KDR2-spezifischer CD8⁺T-Zellen zu untersuchen, wurden C57Bl/6 Mäuse oral mit SB824 (pHR584) immunisiert und die spezifische Immunantwort durch Tetramerfärbung von KDR2⁺CD8⁺T-Zellen aus der Milz und anschließender FACS-Analyse an Tag 6, Tag 14, Tag 21 und Tag 31 nach der Immunisierung untersucht (siehe Abb. 13).





Abb. 13 Zeitschema zur Untersuchung der Kinetik KDR2-spezifischer CD8⁺T-Zellen nach alleiniger oraler Gabe von SB824 (pHR584) und nach Booster-Immunisierung mit BRD620 (pHR584). C57Bl/6 Mäuse wurden an d0 mit SB824 (pHR584) oral immunisiert und an Tag 6, Tag 14, Tag 21 und Tag 31 wurde durch Tetramerfärbung der Milzzellen und FACS-Analyse die KDR2-spezifische CD8+T-Zellantwort bestimmt. Eine zweite Gruppe von Mäusen wurde an d0 mit SB824 (pHR584) oral immunisiert und erhielt an Tag 14 eine Booster-Immunsierung mit BRD620 (pHR584). Die Tetramerfärbung sowie FACS-Analyse erfolgten in dieser Gruppe an Tag 21 (=Booster +7d) und an Tag 31 (=Booster +17d).

Außerdem wurde in einem parallelen Experiment mit Hilfe einer oralen Booster-Immunisierung durch den *S. dublin* Stamm BRD620 (pHR584) an Tag 14 getestet, ob diese zusätzliche Impfung an d0 eine Erhöhung der KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellantwort zur Folge hatte. Dazu wurde die Immunantwort an Tag 21 und Tag 31, also 7 bzw. 17 Tage nach der Booster-Immunisierung gemessen (siehe Abb. 13). Der Salmonellenstamm *S. dublin* BRD620 (pHR584), der für die Immunisierung benutzt wurde, enthält ebenfalls das Plasmid pHR584, auf dem die genetische Information zur Synthese des T3SS-Hybridprotein YopE₁. ₁₃₈-KDR2 kodiert ist.

Die aus der Milz isolierten Zellen wurden in mehreren Schritten für die Messung im Durchflusszytometer (FACS) vorbereitet. Einige dieser Schritte dienen der folgenden Auswertung und Eingrenzung bestimmter Zellbeschaffenheiten und Zelltypen (siehe Abb. 14). Mit Hilfe der FlowJo Software wurden die im FACS analysierten Daten der Milzzellen aus den immunisierten Mäusen sowie nicht immunisierten Kontrollmäusen ausgewertet.

In Abb. 14 ist die Strategie der Auswertung in mehreren aufeinanderfolgenden FACS-Bildern bzw. Diagrammen zu sehen. Die Pfeile zeigen die hierarchische, stufenweise Auswertung. In allen Einzelbildern sind die Zellen in der "Pseudo-color density" Ansicht dargestellt. Diese zweidimensionalen Dichtedarstellungen werden nach dem mathematischen Algorithmus der gleichen Konturierungswahrscheinlichkeit errechnet. Auf diese Weise können die relativen

Frequenzen von Subpopulationen am besten interpretiert werden. Die gesamten isolierten Milzzellen, die im FACS gemessen wurden, sind in Abb. 14a im SSC-A/FSC-A Diagramm dargestellt.



Abb. 14 FACS-Analyse der Tetramerfärbung von Milzzellen immunisierter C57Bl/6 Mäuse. Gezeigt werden angefangen von oben links den Pfeilrichtungen entsprechend folgende FACS-Bilder, die die Strategie der Auswertung erklären: a Zellen im FSC/SSC Diagramm, b Zellen im FSC-H/FSC-A Diagramm, c Eingrenzung der Lymphozyten im FSC/SSC Diagramm, d Ausgrenzung der toten Zellen, e Bestimmung der CD8+T-Zellen, f Bestimmung der KDR2-positiven CD8+T-Zellen. Alle Einzelbilder sind in der "Pseudo-color density"-Darstellung gezeigt.

Zunächst wurden Zellen, die zusammenklebten oder Aggregate bildeten, ausgeschlossen, indem im FSC-H/FSC-A Diagramm nur diejenigen Zellen in die Auswertung integriert wurden, die annähernd auf einer Geraden durch den Nullpunkt mit einer Steigung vom Wert eins liegen. Die Erklärung hierfür ist, dass die Variable FSC ("forward scatter") die Größe der

Zellen reflektiert. FSC-H und FSC-A können vereinfacht dargestellt als Länge und Breite einer Zelle angesehen werden. Da Lymphozyten normalerweise annähernd runde Zellen sind, besitzen sie ein FSC-H zu FSC-A Verhältnis von ungefähr eins, wodurch sie im FSC-H/FSC-A Diagramm auf der oben beschriebenen Geraden liegen (Abb. 14b).

Die so ausgewählten Zellen wurden daraufhin im SSC-A/FSC-A betrachtet, um daraus die Lymphozyten auszuwählen und Zellfragmente und Debris auszuschließen (Abb. 14c). Die Variable SSC stellt die Granularität von Zellen dar. Die SSC-A/FSC-A Ansicht ist die bekannteste anfängliche Darstellungsart von Zellen, die im FACS untersucht werden.

Mit Hilfe des Farbstoffes Propidiumiodid (PI) wurden im folgenden Schritt tote Zellen ausgeschlossen. PI kann nicht in lebende Zellen eindringen, dafür aber in tote bzw. beschädigte Zellen und bindet dort an DNA. Aufgrund der fluoreszenten Eigenschaften von PI, das an DNA gebunden ist, können tote Zellen im PerCP/PE Diagramm ausgeschlossen werden, wie in Abb. 14d dargestellt ist. Es werden nur jene Zellen als lebend eingestuft und in die Auswertung genommen, die nicht doppelt positiv für PerCP und PE gemessen werden.

Diese ausgewählten lebenden Lymphozyten wurden im PE/APC-Cy7 Diagramm auf das Vorhandensein von CD8⁺T-Zellen untersucht. Bei der Oberflächenfärbung vor der FACS-Analyse wurden die Milzzellen mit einem Fluorochrom (APC Alexa Fluor 750 bzw. APC eFluor 780)-gekoppelten Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD8 gefärbt. Im Durchflusszytometer konnten dadurch die CD8-positiven Zellen im entsprechenden Kanal gemessen werden. In Abb. 14e sind diese Zellen graphisch durch einen Rahmen hervorgehoben.

Im letzten Schritt der Auswertung wurden die KDR2-positiven Zellen unter den CD8⁺T-Zellen identifiziert, indem zusätzlich die PE-Fluoreszenz in Betracht gezogen wurde, weil die KDR2-spezifischen Tetramere mit dem Fluorochrom PE gekoppelt sind und daher nur solche CD8⁺T-Zellen als KDR2-spezifisch angesehen werden, die auch eine positive PE-Fluoreszenz aufweisen (Abb. 14f). In dieser Abbildung sind beispielsweise 0,75% der CD8⁺T-Zellen positiv für KDR2, d.h. sie werden hochspezifisch von den KDR2-Tetrameren erkannt und können im FACS im PE-Kanal gemessen werden.

Diese Strategie der Auswertung der FACS Daten wurde auch angewendet, um die Kinetik der Generierung KDR2-spezifischer CD8⁺T-Zellen nach oraler Immunisierung von C57Bl/6 Mäusen mit SB824 (pHR584) zu untersuchen (Zeitschema siehe Abb. 13).

In Abb. 15 sind die prozentualen Werte der KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen in Abhängigkeit der Zeit nach der orogastrischen (oralen) Infektion aufgetragen. Dazu wurden



die im letzten Schritt der Auswertungsstrategie gewonnen Daten der KDR2-positiven CD8⁺T-Zellen in Balkendiagrammen in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen.

Abb. 15 Kinetik der KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellantwort in C57Bl/6 Mäusen nach orogastrischer Immunisierung. C57Bl/6 Mäuse wurden entsprechend des Zeitschemas aus Abb. 13 entweder nur mit SB824 (pHR584) an d0 oder zusätzlich als Booster mit S. *dublin* BRD620 (pHR584) immunisiert und zu den angegebenen Zeitpunkten die KDR2-spezifische Immunantwort durch Tetramerfärbung und FACS-Analyse von Milzzellen untersucht. Gezeigt ist die relative prozentuale Anzahl an KDR2spezifischen CD8⁺T-Zellen bezogen auf die Tetramer-Kontrollwerte von Milzzellen nicht-immunisierter Mäuse. P<0,05</p>

Es wurden hier die relativen prozentualen Werte bezogen auf die Kontrolle angegeben, d.h. die Daten wurden auf einen Standardwert für die Kontrolle normalisiert, um die verschiedenen Tageswerte besser vergleichen zu können. Der Grund hierfür war, dass an den verschiedenen Messtagen unterschiedlich große falsch-positive Werte für Tetramer-positive Milzzellen aus nicht immunisierten Kontrollmäusen gemessen wurden.

Durch diese Normalisierung ergab sich eine konstant abfallende Prozentzahl an KDR2spezifischen $CD8^+T$ -Zellen von Tag 6 bis Tag 31 (Abb. 15). Während relativ gesehen an Tag 6 noch ca. 0,11% der $CD8^+T$ -Zellen positiv für KDR2 getestet wurden, sind es an Tag 14 und Tag 21 nur noch 0,08% bzw. 0,055%. An diesen Tagen konnte jeweils ein signifikanter Unterschied (P<0,05) in der spezifischen Immunantwort zur Kontrolle festgestellt und errechnet werden. Als Kontrolle wurden Milzzellen von nicht immunisierten C57BI/6 Mäusen

mit KDR2-spezifischen MHC I-Tetrameren und CD8-Oberflächenmarkern gefärbt, um unspezifische Bindungen des Tetramers zu berücksichtigen.

An Tag 31 waren diese spezifischen CD8⁺T-Zellen, die VEGFR2⁺ Endothelzellen lysieren und abtöten, nur noch sehr marginal vorhanden. Es war zwar zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle auszumachen.

Im parallelen Versuch mit einer Booster-Immunisierung an Tag 14 mit S. dublin BRD620 (pHR584) zeigte sich, dass sieben Tage nach dieser zusätzlichen Stimulierung des Immunsystems, also an Tag 21, eine Erhöhung der prozentualen KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellantwort um 20% im Vergleich zur einmaligen Immunisierung erzielt werden konnte (Abb. 15a und b, gelber Balken). Wie bei der einmaligen Immunisierung war diese spezifische Immunantwort signifikant höher als in der Kontrolle. nach 17 Tage der Wiederholungsimmunisierung, an Tag 31 des Versuchs, war die Prozentzahl an KDR2spezifischen CD8⁺T-Zellen im Vergleich zur einfachen Immunisierung an d0 nur noch minimal erhöht (türkiser Balken im Diagramm), aber wie bereits erwähnt, kann auch diese minimale Anzahl an spezifischen T-Zellen einen wichtigen Effekt haben.

4.6 Qualität der KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellantwort

Für die Herstellung eines effizienten Impfstoffes ist es außerordentlich wichtig, dass eine langfristige immunologische Gedächtnisantwort induziert wird. Aktuell sind beim Menschen und in Mäusen die Gedächtnis T-Zellpopulationen "central memory" T-Zellen (CMC) und "effector memory" T-Zellen (EMC) bekannt.

Die KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen aus der Milz wurden daher durch die Färbung der Oberflächenmoleküle CD62L (L-Selektin) und CD127 ("Interleukin-7 receptor α-chain") zusätzlich charakterisiert, um Aussagen über die Qualität der Immunantwort bzw. die Induktion von Gedächtnis T-Zellen machen zu können. In Abhängigkeit ihrer Expression erlauben diese beiden Oberflächenmarker die Einteilung von CD8⁺T-Zellen in verschiedene Subtypen. Wie in Abb. 16 links zu sehen, sind bei der Subpopulation Zentrale Gedächtnis-Zellen (CMC) beide Oberflächenmoleküle auf CD8⁺T-Zellen exprimiert, bei "Effektor-Gedächtnis-Zellen (EMC) ist nur CD127, nicht aber CD62L exprimiert und bei Effektor-Zellen (EC) ist keines der beiden Moleküle auf der Zelloberfläche vorhanden.



CD 127 (Interleukin-7 receptor α -chain)

Die CMC- und EMC-Subpopulationen unterscheiden sich neben der Expression der Oberflächenmoleküle auch in ihrer Funktion bezüglich der Proliferationsfähigkeit und Effektorfunktion. CMC proliferieren sehr schnell nach Antigenkontakt, aber sie zeigen keine sofortige Effektorfunktion. Im Gegensatz dazu proliferieren EMC nur schwach, aber sie können eine sehr starke und schnelle Effektorfunktion ausführen, die ansonsten nur bei EC bekannt ist. CMC findet man in lymphatischen Organen, etwa in den Lymphknoten und der Milz. EMC sind vor Allem in nicht-lymphatischen Organen lokalisiert. Beispielsweise befinden sich EMC in der Lunge, in der häufig der erste Antigenkontakt stattfindet (135;136). Wie in Abb. 16 rechts zu sehen ist, wurden die KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen (siehe exemplarisch Abb. 14f) entsprechend der Expression von CD62L und C127 in einem "Contour plot" Diagramm dargestellt. Diese Ansicht ist eine weitere zweidimensionale Dichtedarstellung (neben der oben genannten "Pseudo-color density" Ansicht) der FlowJo

Dichtedarstellung (neben der oben genannten "Pseudo-color density" Ansicht) der FlowJo Software und errechnet sich ebenfalls nach dem mathematischen Algorithmus der gleichen Konturierungswahrscheinlichkeit.

Mit Hilfe dieser Darstellung wurden die KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellsubpopulationen CMC, EMC und EC an den angegebenen Zeitpunkten quantifiziert und in Abb. 17 in Balkendiagrammen dargestellt. Die Bildung dieser Subpopulationen wurde durch die orale Immunisierung mit SB824 (pHR584) induziert.

Abb. 16 Qualität der KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellantwort. Die CD8⁺T-Zellen wurden bei der Tetramerfärbung auch mit den Oberflächenmarkern CD62L und CD127 gefärbt, um sie in Effektor-(EC), Effektor-Gedächtnis- (EMC) oder Zentrale Gedächtnis- (CMC) Zellen einteilen zu können. Links ist ein Schema dieser drei verschiedenen CD8+T-Zellsubpopulationen anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD62L und CD127 zu sehen. Rechts ist exemplarisch ein Konturdiagramm zur Analyse der KDR2-spezifischen CD8+T-Zellsubpopulationen im FACS gezeigt.



Abb. 17 Kinetik der Generierung KDR2-spezifischer CD8⁺T-Zell Subpopulationen nach oraler Immunisierung mit SB824 (pHR584). C57Bl/6 Mäuse wurden an d0 immunisiert und an den angegebenen Zeitpunkten wurde mittels Oberflächenfärbung und FACS-Analyse von Milzzellen die Generierung der CD8+T-Zellsubpopulationen EC, EMC und CMC untersucht und quantifiziert.

An Tag 6 nach oraler Immunisierung mit SB824 (pHR584), die das immunogene Epitop KDR2 von VEGFR2 mit Hilfe des T3SS in das Zytosol von Zielzellen translozieren, stellten ca. 60 % der KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen Effektor T-Zellen dar (Abb. 17). Die Gedächtnis T-Zellpopulationen CMC und EMC waren zu diesem frühen Zeitpunkt der Vakzinierung nur mit 12% bzw. 15% repräsentiert. An Tag 14 hingegen machten diese beiden CD8⁺T-Zellsubpopulationen bereits 45% bzw. 25% der KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen aus. Der prozentuale Anteil an EC war zwei Wochen nach der Infektion auf ca. 22% zurückgegangen. Drei Wochen nach der oralen Salmonellengabe blieben die CMC mit über 40% die dominante Subpopulation, der Anteil an EMC war auf 32% angestiegen und die EC machten nur noch 15% der spezifischen CD8⁺T-Zellen aus.

Zusammenfassend ließ sich ein klarer Trend in der Kinetik der KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen nach oraler Immunisierung mit SB824 (pHR584) feststellen. Während EC zu Beginn der Vakzinierung nach sechs Tagen in der Maus die dominante Subpopulation darstellten,

nahmen im Laufe der Infektion die Gedächtnis T-Zellpopulationen CMC und EMC die beherrschende Stellung unter den KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen ein.

4.7 Effekt einer Kombinationsimmunisierung auf die KDR2-spezifische Immunantwort

Unsere Arbeitsgruppe konnte vor Kurzem zeigen, dass die Quantität der spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort durch eine Kombinationsimmunisierung mit Salmonellen sowie CpG-Oligonukleotiden und antigenem p60-Peptid deutlich erhöht werden konnte und zu einer sterilen Immunität gegen Listerien führte. Dabei wurden Salmonellen, die das Listerien Antigen p60 über das T3SS translozieren, auf oralem Weg sowie CpG-DNA und das immundominante p60-Peptid subkutan verabreicht (137). CpG-Oligonukleotide werden vom angeborenen Immunsystem durch TLR9 erkannt und lösen eine starke Immunantwort aus (138). Sie werden als Adjuvantien verwendet.

Diese Kombinationsstrategie, die in BALB/c Mäusen durchgeführt wurde, sollte nun auf die Anti-angiogene Vakzinierung gegen VEGFR2 in C57Bl/6 Mäusen angewendet werden, um die spezifische Immunantwort möglicherweise ebenfalls zu verstärken.

Wie in Abb. 18 zu sehen ist, wurde an d0 die orogastrische Immunisierung mit SB824 (pHR584) durchgeführt, an Tag 7 die Lösung aus CpG-DNA und immunodominantem KDR2-Peptid subkutan verabreicht und an Tag 21 mittels Tetramerfärbung und FACS-Analyse die KDR2-spezifische CD8⁺T-Zellantwort gemessen.



Abb. 18 Zeitschema zur Kombinationsimmunisierung mit SB824 (pHR584) und einer Mischung aus CpG-Oligonukleotiden und KDR2-Peptid. An d0 erfolgte die orogastrische Immunisierung von C57Bl/6 Mäusen mit SB824 (pHR584), an Tag 7 die subkutane Applikation einer gemischten Lösung aus CpG-Oligonukleotiden und KDR2-Peptid und an Tag 21 die Messung der spezifischen Immunantwort durch Färbung der Milzzellen mit Oberflächenmarkern und dem KDR2-Tetramer und anschließender FACS-Analyse.

Im Gegensatz zum BALB/c Mausmodell mit p60 als Modellantigen ergab sich bei der Kombinationsimmunisierung in C57Bl/6 Mäusen mit KDR2 als Antigen keine signifikante Erhöhnung der spezifischen CD8⁺T-Zellantwort In Abb. 19 ist zu sehen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen "SB824 (pHR584)+CpG+Peptid" und "SB824(pHR584)" gibt. Im Vergleich zur Kontrolle ist die generierte KDR2-spezifische Immunantwort in diesen beiden Gruppen signifikant und bestätigt damit das Ergebnis aus der Untersuchung zur Kinetik KDR2-spezifischer CD8⁺T-Zellen, bei der an Tag 21 ein signifikanter Unterschied festgestellt wurde (siehe Abb. 15).



Abb. 19 KDR2-spezifische CD8⁺T-Zellantwort nach Kombinationsimmunisierung. C57Bl/6 Mäuse wurden entweder nicht immunisiert (Kontrolle), mit SB824 (pHR584) sowie CpG+KDR2-Peptid, nur mit SB824 (pHR584) oder nur mit CpG+KDR2-Peptid immunisiert. An Tag 21 wurde mit Hilfe von Tetramerfärbung und FACS-Analyse die Anzahl an KDR2-positiven CD8⁺T-Zellen in der Milz bestimmt.

Im Gegensatz zur Peptidvakzinierung von Dong und Kollegen (80) konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe "CpG+Peptid" und der Kontrollgruppe ermittelt werden. Im Tumorschutzexperiment konnte mit dieser Strategie auch keine

signifikante Reduktion des Tumorwachstums durch die Kombinationsimmunisierung erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

4.8 Immunisierung gegen VEGFR2 reduziert Angiogenese

Niethammer und Kollegen haben vor einiger Zeit gezeigt, dass die DNA-Vakzinierung gegen VEGFR2 zu einer effizienten Reduktion der Angiogenese und dadurch auch des Tumorwachstums im Maus-Tumormodell führte (96). Die Angiogenese ist auch der Angriffspunkt der oben beschriebenen Proteinimmunisierungsstrategie gegen VEGFR2 mittels T3SS der Salmonellen.

Dieser Effekt der Reduktion des Tumorwachstums wurde auch mit SB824 (pHR584) in Maus-Tumormodellen getestet. Im Flankentumormodell wurden die Mäuse zweimal mit Salmonellen immunisiert, bevor die B16F10 Tumorzellen in die Flanke appliziert wurden. Die erste orogastrische Immunisierung erfolgte mit *S. typhimurium* SB824 (pHR584) und zwei Wochen danach eine zweite orogastrische Immunisierung mit *S. dublin* BRD620 (pHR584), um das Immunsystem zusätzlich zu stimulieren und die spezifische Immunantwort zu erhöhen (wie in Abb. 15 gezeigt). Nach de Tumorapplikation an d30 wurde das Tumorwachstum zwei Wochen lang bis Tag 44 beobachtet und die Tumorfläche durch Bestimmen von Länge und Breite mit einer Schublehre gemessen (Abb. 20). Das Experiment wurde an Tag 44 beendet und die Tumore für histologische Untersuchungen vorbereitet.



Abb. 20 Zeitschema zum Flankentumorversuch mit dem B16F10-Melanom. An d0 erfolgte die erste Immunisierung mit SB824 (pHR584) und an Tag 14 die WiederholungsImmunisierung mit S. *dublin* BRD620 (pHR584). Die Dosis der orogastrischen Immunisierung betrug jeweils 5 x 10⁸ Bakterien pro Maus in einem Volumen von 100 μl. An d30 wurden die Melanom-Tumorzellen subkutan (sc) in die Flanke der Mäuse injiziert und in den darauffolgenden zwei Wochen das Tumorwachstum gemessen.

Ein gängiger Oberflächenmarker für Endothelzellen ist CD31 (auch genannt PECAM-1) (96;139). Durch Immunfluoreszenz-Färbungen dieses Oberflächenmarkers in Kryoschnitten von Flankentumoren lassen sich Blutgefäße im Tumor sichtbar machen.

Im Experiment wurden die Tumore an Tag 44 aus der Flanke der Maus entnommen, fixiert, tief gefroren und Kryoschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden gleichmäßig verteilt aus dem ganzen Tumorvolumen angefertigt, d.h. die Blutgefäßversorgung wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung im gesamten Tumor untersucht. Neben der Färbung mit einem FITC-gekoppelten Antiköper gegen CD31 wurde die DNA mit DAPI gefärbt, sodass die Zellkerne durch ihre dunkelblaue Färbung gut zu erkennen waren (Abb. 21).



 Abb. 21 Immunfluoreszenzfärbung von Tumorschnitten. An Tag 44 wurden Kryoschnitte der Melanomtumore angefertigt und eine HE bzw. Immunfluoreszenz (IF) Färbung gegen CD31 (grün) durchgeführt. Außerdem wurde bei der IF-Färbung die DNA durch DAPI blau gefärbt. a-c Repräsentative Bilder der HE Färbung der Melanomschnitte von den 3 verschiedenen Versuchsgruppen des Flankentumorexperiments, d-f Repräsentative Bilder der IF-Färbung der Tumorschnitte.

Wie in Abb. 21 zu sehen, wurden auch HE-Färbungen der Tumorschnitte durchgeführt, um das maligne Gewebe der Melanome und die Tumorstruktur sichtbar zu machen. Bei dieser Färbung werden saure Moleküle durch das Hämatoxilin angefärbt und dargestellt, wodurch vor Allem Zellkerne, aber auch saure Schleimsubstanzen, Bakterien und Kalk blau gefärbt werden. Im Gegensatz dazu gibt der Farbstoff Eosin dem Zytoplasma der Zellen, sowie

Kollagen und proteinhaltige Lösungen eine rötliche Farbe. Aus den gezeigten, exemplarischen Tumorschnitten war aufgrund der HE-Färbung deutlich ersichtlich, dass es sich dabei um Tumorgewebe handelt. Die Zellkerne waren größer als jene von vergleichbaren normalen Zellen, die Form der Kerne war unregelmäßig und der Zytoplasmagehalt der Tumorzellen war verringert.

Nachdem sichergestellt wurde, dass es sich bei den Schnitten tatsächlich um Tumorgewebe aus dem Melanom-Flankentumor handelte, wurde die Immunfluoreszenzfärbung der Endothelzellen mit Hilfe des CD31 Markers näher betrachtet. Im Vergleich der Immunfluoreszenzbilder der drei Versuchsgruppen, auf denen CD31-positive Endothelzellen in grün und Zellkerne durch DAPI in blau dargestellt sind, ließ sich auf den ersten Blick erkennen, dass die grüne CD31-Färbung in den Schnitten der mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisierten Mäuse deutlich verringert war (rechtes Bild, "SB824 (pHR584)"). Die hier gezeigten Bilder sind beispielhaft für jeweils mehr als 30 Tumorschnitte, die pro Versuchsgruppe aus den Tumoren verschiedener Mäuse gemacht wurden. In den beiden Kontrollgruppen (Kontrolle und SB824) war die FITC-Fluoreszenz des CD31-Antikörpers stark ausgeprägt, während sie bei den Tumoren der immunisierten Mäuse (SB824 (pHR584)) stark reduziert war. Beim Blick auf die CD31-positiven Endothelzellen der Kontrollgruppen ließ sich das Blutgefäßsystem, das die Tumore versorgt, eindeutig identifizieren.

Um diesen optischen Eindruck quantitativ auszuwerten und zu objektivieren, wurde die Fläche der CD31-FITC-Immunfluoreszenz in den zahlreichen Tumorschnitten durch eine Software gemessen und dadurch indirekt die Größe des Tumor versorgenden Blutgefäßsystems bestimmt, sodass die einzelnen Versuchsgruppen miteinander verglichen werden konnten. In Abb. 22 sind die Mittelwerte der Fläche, die die CD31-FITC-Fluoreszenz in den mindestens jeweils 30 ausgewerteten Tumorschnitten pro Versuchsgruppe ausmachte, dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Fläche der CD31 Fluoreszenz zwischen den Kontrollgruppen und der mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisierten Gruppe von C57Bl/6 Mäusen (siehe Abb. 20). Damit konnten die optischen Eindrücke aus den einzelnen Immunfluoreszenzaufnahmen auch quantitativ bestätigt werden. Die signifikant reduzierte CD31-Fluoreszenz in der Versuchsgruppe SB824 (pHR584) zeigte, dass die Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen durch die Salmonellen-vermittelte Immunisierung gegen VEGFR2 signifikant reduziert wurde. Die Fläche, die die CD31-Fluoreszenz in dieser

Gruppe ausmachte, betrug im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen nur noch 38%. Dies entsprach einer Reduktion um fast zwei Drittel.



Abb. 22 Quantifizierung der CD31-FITC Fluoreszenz in gefärbten Melanomschnitten. In jeweils 30 zufällig ausgewählten Tumorschnitten der drei verschiedenen Versuchsgruppen wurde die Fläche der CD31-FITC Fluoreszenz mit Hilfe der Cell^P Software ausgewertet und deren Mittelwerte dargestellt. P<0,05

4.9 Immunisierung gegen VEGFR2 reduziert Tumorwachstum

Durch die Immunfluoreszenz-Mikroskopie der Melanomschnitte aus dem Flankentumorexperiment konnte mit Hilfe des CD31-Antikörpers eindrucksvoll gezeigt werden, dass die Blutgefäßversorgung des Tumors durch die Salmonellen-vermittelte Vakzinierung gegen VEGFR2 deutlich verringert wurde. In diesem Tumorexperiment in C57Bl/6 Mäusen (Zeitschema siehe Abb. 20) wurde auch das absolute Tumorwachstum an der Mausflanke beobachtet und gemessen. Dazu wurde mit Hilfe eines Kalipers ab Tag 36 (entspricht Tag 6 nach der Applikation der B16F10-Melanomzellen) durch Bestimmen von Länge und Breite das Tumorwachstum an der Flanke der C57Bl/6 Mäuse dokumentiert.

Wie in Abb. 23a auf den klinischen Bildern zu sehen, entwickelte sich sowohl in den nicht immunisierten Mäusen (Kontrolle) als auch in den mit SB824 immunisierten Mäusen (SB824) bis Tag 38 ein gut sichtbarer Tumor an der Flanke mit einer Fläche von 36 bzw. 28 mm² (Abb. 23b). In den mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisierten Mäusen betrug die Tumorfläche zu diesem Zeitpunkt hingegen im Mittel nur 15 mm² und war daher um ca. 50%

geringer als in den Kontrollgruppen. Einige Mäuse dieser Gruppe entwickelten an Tag 38 noch kein Tumorwachstum (Abb. 23a, rechtes Bild).



Abb. 23 Reduziertes Tumorwachstum durch Immunisierung gegen VEGFR2. a Klinische Bilder von C57Bl/6 Mäusen mit subkutan applizierten B16F10-Melanomzellen an der Flanke. Von links nach rechts sind die experimentellen Versuchsgruppen Kontrolle, SB824 und SB824 (pHR584) gezeigt. Von jeder Gruppe wurde exemplarisch eine Maus an Tag 38 und Tag 42 des Experiments fotografiert. b Das Tumorwachstum (Tumorfläche) wurde über eine Dauer von zwei Wochen mit einem Kaliper gemessen und der Mittelwert sowie Standardabweichung von zehn Tumoren graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind von einem repräsentativen Experiment von 3 unabhängigen Experimenten.

Die Tumorgröße bzw. -fläche nahm in allen Gruppen im Laufe des Versuch zu. In den Kontrollgruppen betrug sie an Tag 42 bereits 85 bzw. 82 mm² und war somit doppelt so groß wie in der Gruppe SB824 (pHR584), bei der im Mittel ein Tumorgröße von 42 mm² gemessen

wurde. Auf den klinischen Bildern in Abb. 23a sieht man, dass die Tumore in den Kontrollgruppen auch optisch sehr viel größer erscheinen als in der mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisierten Gruppe von Mäusen. In den Kontrollgruppen war eine bis zu 150 mm² große, teilweise schwarze Erhebung in der Flanke der Mäuse sichtbar, während sich bei den Mäusen, die mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisiert wurden, nur ein bis zu 70 mm² großes Geschwür entwickelte.

Am Ende des Versuchs, an Tag 44, also 14 Tage nach der Tumorapplikation, blieben die Verhältnisse der Tumorflächen zwischen den einzelnen Gruppen konstant. In den Kontrollgruppen war die Fläche an Tag 44 auf ca. 120 mm² angewachsen und in der Anti-Angiogenese Gruppe betrug sie 62 mm² und war damit signifikant kleiner als in beiden Kontrollgruppen. Diese Signifikanz war an allen Messtagen gegeben, also an Tag 36, Tag 38, Tag 40, Tag 42 und Tag 44. Am Ende des Experiments waren die Tumore der Mäuse, die präventiv mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisiert wurden, im Durchschnitt also nur halb so groß wie die Tumore der Kontrollmäuse.

Flankentumorexperimente mit B16F10-Melanomzellen sind nur auf zwei Wochen ausgelegt, weil diese Tumorzellen sehr aggressiv in ihrem Wachstum sind und sich die Tumore ab diesem Zeitpunkt intensiv ausbreiten. Außerdem kommt es dann gelegentlich zur Tumornekrose.

Im Flankentumorexperiment ließ sich in der Kontrollgruppe und in der Gruppe, die mit SB824 immunisiert wurde, an Tag 6 bei 100% der Mäuse ein Tumorwachstum an der Flanke feststellen (Abb. 24). In der experimentellen Gruppe von Mäusen, die mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisiert wurde, waren hingegen bis Tag 6 nach der Applikation der B16F10-Melanomzellen 20% der Tiere frei von Tumoren, d. h. in 80% der Mäuse hatte sich bis dahin ein Tumor gebildet.

Bis 12 Tage nach der Tumorapplikation (Tag 42) waren immerhin zehn Prozent der Mäuse in der mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisierten Gruppe frei von Tumoren. 14 Tage nach dem Tumorsetzen (Tag 44), als das Experiment beendet wurde, wuchs auch bei diesen bis dahin Tumor-freien Mäusen ein kleiner Tumor.



Abb. 24 Tumor-freie Mäuse im Flankentumorexperiment. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Mäusen, bei denen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Applikation der B16F10-Melanomzellen kein Tumorwachstum im Flankentumorexperiment festzustellen war.

4.10 Verminderung der Metastasierung durch Hemmung der Angiogenese

Durch das Flankentumorexperiment wurde gezeigt, dass KDR2-spezifische CD8⁺T-Zellen über die teilweise Inhibierung der Angiogenese zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums führten, weil die Blutgefäßversorgung und dadurch das Tumorwachstum in den SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisierten Mäusen deutlich reduziert war. Mit Hilfe des künstlichen Metastasierungsmodells sollte untersucht werden, ob die Salmonellen T3SS-vermittelte Generierung von KDR2-positiven CD8⁺T-Zellen und deren Effekt auf die Angiogenese ebenfalls Auswirkungen auf die Bildung von Lungenmetastasen und damit auf die Etablierung eines Sekundärtumors hat.

Die Blockierung der Aktivität von VEGF-A oder der Funktion seiner Rezeptoren (z.B. VEGFR2) hat in zahlreichen Tier-Tumormodellen neben der Reduktion des Tumorwachstums eine verminderte Metastasierung zur Folge gehabt (85;101;102).

In diesem künstlichen Lungenmetastasierungsmodell wurden C57Bl/6 Mäuse zweimal mit je 5 x 10^8 Salmonellen orogastrisch immunisiert, bevor 2 x 10^5 B16F10-Melanomzellen intravenös in die Schwanzvene appliziert wurden. Die erste orogastrische Immunisierung

erfolgte mit *S. typhimurium* SB824 (pHR584) und zwei Wochen danach schloß sich eine zweite orogastrische Immunisierung mit *S. dublin* BRD620 (pHR584) an, um das Immunsystem zusätzlich zu stimulieren und die spezifische Immunantwort zu erhöhen. Die experimentelle Abfolge wird in Abb. 25 graphisch in einem Zeitschema dargestellt. Nach dem Beginn der künstlichen Metastasierung durch die intravenöse Gabe der Tumorzellen an Tag 30 wurden die Mäuse zwei Wochen lang bis Tag 44 beobachtet, um Auffälligkeiten bezüglich Verhalten und Krankheitssymptomen zu dokumentieren. Das Experiment wurde an Tag 44 beendet und die Lungen der Mäuse für makroskopische Untersuchungen aus den getöteten Tieren entnommen.



Abb. 25 Zeitschema zum künstlichen Metastasierungsmodell mit der B16F10-Melanomzelllinie. An d0 erfolgte die erste Immunisierung mit SB824 (pHR584) und an Tag 14 die Wiederholungsimmunisierung mit *S. dublin* BRD620 (pHR584). Die Dosis der orogastrischen Immunisierung betrug jeweils 5 x 10⁸ Bakterien pro Maus in einem Volumen von 100 μl. An d30 wurden 2 x 10⁵ Melanom-Tumorzellen i.v. in die Schwanzvene der Mäuse injiziert und zwei Wochen später an Tag 44 die Lungenmetastasen analysiert.

Als Maßstab für die mögliche Effizienz der Salmonellen T3SS-vermittelten Vakzinierung gegen VEGFR2 wurden die Metastasen auf den Lungen der Mäuse verschiedener Versuchsgruppen am Ende des Experiments (Tag 44) ausgezählt. In Abb. 26 a und b sind jeweils zehn entnommene Lungen von Mäusen, die präventiv mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) geimpft wurden (a), und nicht immunisierten Mäusen, denen Tumorzellen i.v. gespritzt wurden (b), gezeigt. Außerdem ist jeweils die Vergrößerung einzelner Lungen bzw. Lungenflügel aus Mäusen beider Versuchsgruppen zu sehen. Der deutliche Unterschied zwischen den Lungen der Versuchgruppen war eindeutig erkennbar. Während bei den Lungen der immunisierten Mäuse die ursprüngliche, natürliche Farbe noch gut zu erkennen war und einzelne Lungenmetastasen als dunkle Flecken auszumachen waren (Abb. 26a), waren die

Lungen der nicht immunisierten Kontrollmäuse fast vollständig von den Metastasen bedeckt, was durch die dunkle Färbung gut zu sehen war (Abb. 26b). Beim Vergleich der vergrößerten Ausschnitte wurde dieser Unterschied umso deutlicher.

Für die quantitative Auswertung der Metastasenbildung wurde mit Hilfe einer Software die Anzahl der Metastasen der zehn Mäuselungen berechnet und die Mittelwerte dieser Zahlen pro Lunge zum Vergleich in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 26c). In der Kontrollgruppe waren pro Lunge im Durchschnitt fast 1200 Lungenmetastasen festzustellen, wohingegen in den immunisierten Mäusen nur etwa 480 Metastasen im Mittel gezählt wurden. Diese Anzahl entsprach nur 40% der in den Kontrolllungen gefundenen Metastasen.



 Abb. 26 Auswertung der Lungenmetastasen im künstliches Metastasierungsmodell nach Salmonellen-Immunisierung gegen VEGFR2. a Lungen von 10 präventiv mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immuniserten Mäusen sowie Vergrößerung einer Lunge, b Lungen von 10 nicht immuniserten Kontrollmäusen sowie Vergrößerung einer Lunge, c Anzahl an Metastasen in 10 Lungen, d Prozentualer Anteil der durch Metastasen bedeckten Lungenfläche.

In einer weiteren Darstellung wurde der prozentuale Anteil der von den Metastasen bedeckten Lungenfläche analysiert (Abb. 26d). Entsprechend der durchschnittlichen Anzahl an Metastasen pro Lunge waren in der Kontrollgruppe fast 90% der Lungenfläche von Metastasen bedeckt, wodurch die Lungen annähernd vollkommen schwarz erschienen. In den immunisierten Mäusen war hingegen nur 35% der Lungenfläche von Metastasen bedeckt.

Der Allgemeinzustand der immunisierten Mäuse im Laufe der zwei Wochen nach der Applikation der Tumorzellen war deutlich besser als jener der Kontrollmäuse. Während bei Ersteren keine äußerlichen Auffälligkeiten auszumachen waren, sahen die nicht immunisierten Mäuse deutlich krank aus. Dies ließ sich an der gekrümmten Körperhaltung und am geringeren Körpervolumen bzw. der Größe der Mäuse zum Ende des Experiments hin ausmachen. Die Krankheitssymptome waren mit großer Wahrscheinlichkeit auf die fast vollständig mit Metastasen bedeckten Lungen der Kontrollmäuse zurückzuführen.

Mäuse, die mit SB824 immunisiert wurden, zeigten ähnlich hohe Metastasierungsraten bezüglich Anzahl und bedeckter Lungenfläche wie die nicht immunisierten Kontrollmäuse. Ein Effekt der Infektion allein mit Salmonellen auf die Metastasierung von Melanomzellen im künstlichen Metastasierungsmodell war somit ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der Effekt der präventiven Immunisierung mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) die Ausbildung von Metastasen im künstlichen B16F10-Modell um 60% gegenüber nicht immunisierten Mäusen reduzierte und, dass der Allgemeinzustand der immunisierten Mäuse während der künstlichen Metastasierung erheblich besser war als jener von nicht immunisierten Mäusen.

Rekombinante, avirulente Salmonellenstämme können komplexe mukosale und systemische Immunantworten induzieren und werden daher intensiv als Lebendimpfstoffträger erforscht. Durch orale Applikation werden sie als Transportmittel für heterologe Antigene eingesetzt (96). In der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante Salmonellen als Impfstoffträger für die Tumorvakzinierung gegen VEGFR2 getestet.

Die Historie von attenuierten Bakterien als Lebendimpfstoffträger geht zurück auf die Entwicklung des Bacillus-Calmette-Guerin (BCG)-Impfstoffs gegen Tuberkulose (140) und die Herstellung und Lizenzierung der aktuellen Typhus-Vakzine Ty21a (141). Diese Impfstoffe bewiesen, dass Bakterien so attenuiert werden können, dass ihre Verabreichung nicht mehr letal verläuft, sondern eine schützende Immunantwort gegen eine Wildtyp-Infektion induziert. Nach diesem Prinzip wird seither versucht, pathogene Bakterien zu attenuieren, um sie als Lebendimpfstoff bzw. Lebendimpfstoffträger einsetzen zu können.

In frühen Studien mit attenuierten *S. typhimurium*-Stämmen in Mäusen konnte gezeigt werden, dass somatische Antigene (LPS) der Salmonellen für die Induktion einer schützenden Immunantwort wichtig sind (142). Durch große Fortschritte in der rekombinanten DNA-Technologie wurde die Herstellung attenuierter Stämme stark vereinfacht.

Die nächste Stufe in der Entwicklung von *S. typhimurium* als Lebendimpfstoffträger war die stabile Synthese von heterologen Antigenen, deren genetische Information meist auf einem transformierten Plasmid kodiert war. Durch die isolierte Lokalisation der Salmonellen in einem Makropinosom der Wirtszelle, wurde das Fremdantigen in diese membrangebundene Vakuole sekretiert und auf dem MHC-Klasse II-Antigenpräsentationsweg prozessiert, wodurch eine gerichtete CD4 T-Zellantwort induziert wurde. Fairweather und Kollegen konnten so im Mausmodell nachweisen, dass ein attenuierter *S. typhimurium*-Stamm, der ein Fragment des Tetanus-Toxins synthetisierte, eine schützende Immunität gegen eine letale Dosis des Tetanus-Toxins induziert (143).

In der ersten Studie über die Induktion einer Immunantwort durch rekombinante Salmonellen im Menschen diente das Malaria Circumsporozoit Antigen (CSP) als Fremdprotein (144). Rüssmann und Kollegen benutzten das T3SS von Salmonellen, um heterologe Antigene, die translational an ein Trägermolekül fusioniert waren, in das Zytosol von APCs zu dirigieren. Auf diese Weise wurden die Fremdantigene auf dem MHC Klasse I-Weg prozessiert und es wurde eine CD8⁺T-Zellantwort induziert, die für einen effizienten Schutz gegen eine virale

Infektion mit LCMV essentiell war (38). Basierend auf diesem Prinzip konnten sie mit der Methode der T3SS-vermittelten Translokation von heterologen Antigenen auch Immunität von Mäusen gegen eine Listerieninfektion erzeugen (39). Entscheidend war hierbei die effiziente Induktion einer zytotoxischen CD8⁺T-Zellantwort gegen die heterologen Antigene. Ebenfalls mit dieser Vazinierungsstrategie konnten Lotter und Kollegen signifikante Schutzraten gegen die Bildung von Leberabszessen durch Amöben erzielen (145). Sie benutzten einen attenuierten *Yersinia enterocolitica*-Stamm als Lebendvakzine. Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass rekombinante Salmonellen, die Fragmente des Masernvirus (MV) über das Hämolysin-System aus *E. coli* sekretieren, eine MV-spezifische humorale und zelluläre Immunantwort in Mäusen induzieren (146).

Diese Vakzinierungsstrategie wurde neben der Impfung gegen Pathogene auch als präventive Methode zur Verhinderung von Krebserkrankungen im Mausmodell getestet. Panthel und Kollegen wiesen nach, dass 80% der untersuchten Mäuse durch die präventive Impfung mit p60₂₁₇₋₂₂₅-translozierenden Salmonellen vor Fibrosarkomen geschützt waren, die stabil mit dem Listerienantigen p60₂₁₇₋₂₂₅ transfiziert worden waren (47). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Impfmethode mittels Salmonellen zur Immunisierung gegen VEGFR2 angewendet, um die Blutgefäßversorgung von Tumoren zu blockieren.

Monoklonale Antikörper und andere Wirkstoffe, die den Hauptsignalweg der Tumorangiogenese über den Vaskularisierungsfaktor VEGF-A und dessen Rezeptor VEGFR2 blockieren, haben in klinischen Tests vielversprechende Ergebnisse in Tumorpatienten erzielt und einige Medikamente, wie beispielsweise der an VEGF-A bindende monoklonale Antikörper Bevacizumab, sind bereits für den Gebrauch im Menschen bei einigen Krebsarten zugelassen. Die immuntherapeutische Strategie der Anti-Angiogenese hat den Vorteil, dass die Zielantigene nicht auf Krebszellen zu finden sind, sondern primär auf aktivierten vaskulären Endothelzellen, die das Tumor-versorgende Blutgefäßsystem bilden.

VEGFR2 ist ein entscheidender Faktor in der Tumorangiogenese und ist auf proliferierenden Endothelzellen überexprimiert. Endothelzellen sind im Gegensatz zu Tumorzellen genetisch stabil und entwickeln mit großer Wahrscheinlichkeit keine Resistenzen gegen Therapeutika. Bei Endothelzellen kommt es auch nicht zur Herunterregulation von MHC-Molekülen, wie das bei Tumorzellen oft der Fall ist (109). Außerdem ist die Strategie, die Tumor versorgenden Endothelzellen anzugreifen, auf viele verschiedene Tumorarten anwendbar, weil das therapeutische Ziel durch den Bedarf aller Tumorarten an einer Gefäßversorgung unabhängig vom Tumor ist (96). Zusätzlich erreicht man einen Multiplikationseffekt, weil

eine Endothelzelle mehrere Hundert Tumorzellen versorgt (109). Ein weiterer Vorteil ist, dass die proliferierenden Endothelzellen im Tumorgefäßsystem gut zugänglich für die CTLs sind.

In bisherigen klinischen Studien wurden hauptsächlich Antikörper zur Anti-Angiogenese Immuntherapie verwendet. In zahlreichen präklinischen und klinischen Entwicklungsstudien wurden auch andere Ansätze getestet, um eine Immuntherapie gegen Krebs mittels Anti-Angiogenese durchzuführen. Dabei wurden unter Anderem fixierte Endothelzellen (147), VEGFR2-konjugierte Proteine (148), VEGFR2-gepulste DCs (109;110), liposomale Peptide des "fibroblast growth factor-2" (149) und verschiedene DNA-Vakzine gegen Survivin, Integrin β_3 , VEGF und VEGFR2 (150) zur anti-angiogenen Immunisierung verwendet. Neuere Studien im Mausmodell haben gezeigt, dass die Tumorangiogenese mit Hilfe einer DNA-Vakzinierung durch die Induktion einer zellulären Immunantwort gegen den "Vascular endothelial growth factor receptor 2" (VEGFR2) blockiert werden kann (96). Dieser DNA-Impfstoff schützte Mäuse effektiv vor dem Wachstum von Melanom-, Kolonkarzinom- und Lungenkarzinomzellen und reduzierte das Auftreten von Metastasen in einem präventiven VEGFR2 im Mausmodell eingesetzt, um das Wachstum und die Metastasierung gegen VEGFR2 im Mausmodell eingesetzt, um das Wachstum und die Metastasierung von Lungenkarzinomen und Melanomen zu inhibieren (151).

Im Gegensatz zur DNA-Vakzinierung wurde in dieser Doktorarbeit eine Protein-Vakzinierungsstrategie getestet. Es konnte gezeigt werden, dass der rekombinante Salmonellenstamm SB824 (pHR584) in C57Bl/6 Mäusen eine zelluläre CD8⁺T-Zellantwort gegen das immundominante Epitop KDR2 von VEGFR2 induziert, wodurch die Tumorangiogenese blockiert und dadurch das Tumorwachstum sowie die Metastasierung von Melanomen inhibiert wurde. Mit Hilfe des T3SS von rekombinanten Salmonellen wurden immunogene Epitope von VEGFR2 in das Zytosol von APCs transportiert und dadurch eine spezifische CD8⁺T-Zellantwort gegen VEGFR2 induziert.

Diese Tumorvakzinierung gegen VEGFR2 mittels heterologem Antigentransport durch rekombinante Salmonellen ist ein komplexes Thema, das mehrere Teilbereiche der Biologie bzw. Medizin bearbeitet. Dadurch müssen neben onkologischen und immunologischen Aspekten auch Bereiche der medizinischen Mikrobiologie diskutiert werden.

Gram-negative Salmonellen besitzen die Fähigkeit, phagozytische und nicht-phagozytische Zellen zu invadieren und verweilen in der membrangebundenen SCV, die die Bakterien vom

zytosolischen Kompartiment der Wirtszelle isoliert (2). Salmonellenproteine und –antigene werden durch ihre Lokalisation im Makropinosom nur auf dem MHC II-Antigenpräsentationsweg prozessiert, wodurch eine CD4⁺T-Zellantwort induziert wird. Der Gebrauch von Salmonellen als Impfstoffträger setzt allerdings voraus, dass eine CD8⁺T-Zellantwort generiert wird, um einen Schutz vor Tumoren, Viren und intrazellulären Bakterien zu erzielen (36;38;43). Deshalb wurde SB824 (pHR584) molekular so konstruiert, dass die immunogenen Epitope KDR2 und KDR3 mit Hilfe einer translationalen Fusion an das T3SS-Effektorprotein YopE gebunden und dadurch über das T3SS in das Zytosol der Wirtszelle transportiert wurden. Auf diese Weise wurden die Hybridproteine YopE₁₋₁₃₈-KDR2 bzw. YopE₁₋₁₃₈-KDR3 auf dem MHC I-Antigenpräsentationsweg prozessiert und auf der Zelloberfläche auf MHC I-Molekülen an CD8⁺T-Zellen präsentiert, sodass eine spezifische CD8⁺T-Zellantwort gegen die Epitope KDR2 und KDR3 von VEGFR2 induziert werden konnte.

Die Plasmide pHR580 (extrazelluläre Domäne von VEGFR2), pHR583 (KDR3 Epitop) und pHR584 (KDR2 Epitop) wurden so kloniert, dass eine translationale Fusion aus der Translokationsdomäne von YopE und den jeweiligen immunogenen Epitopen von VEGFR2 entstand (siehe Abb. 8). Als Promotor wurde der *lac*-Promotor gewählt, da dieser in Salmonellen konstitutiv aktiv ist.

Bei der Interaktion von *Yersinia enterocolitica* mit antigenpräsentierenden Phagozyten vermittelt die YopE-Translokation die Resistenz der Bakterien gegen Phagozytose und die Fähigkeit zum extrazellulären Überleben (152;153). Verschiedene Komponenten von Typ III Sekretionssystemen unterschiedlicher Bakterienspezies sind funktionell konserviert. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass Typ III Gene durch horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Spezies weitergegeben wurden. Durch diese funktionelle Konservierung war es möglich, das YopE-System aus *Yersinia enterocolitica* auch in *S. typhimurium* zu benutzen. Aufgrund der Erfahrung in unserer Arbeitsgruppe mit YopE als Fusionsprotein mit den heterologen Antigenen p60 und LLO, wurde das T3SS-Effektorprotein YopE auch für die Herstellung der verschiedenen Plasmide zur Tumorvakzinierung gegen VEGFR2 verwendet.

In Proteinexpressionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine YopE₁₋₁₃₈-KDR2 und YopE₁₋₁₃₈-KDR3 von den Salmonellen exprimiert werden. Im Immunblot mit einem anti-YopE-Antikörper konnte aus dem Ganzzelllysat jeweils eine entsprechende
Proteinbande eindeutig nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde im Western Blot gezeigt, dass die neuartigen Fusionsproteine in den Kulturüberstand sekretiert wurden, da aus dem Überstand der jeweiligen Salmonellenkultur eine Proteinbande detektiert wurde. Die in Abb. 10 im Western Blot gezeigten Proteinbanden der Hybridproteine YopE₁₋₁₃₈-KDR2 bzw. YopE₁₋₁₃₈-KDR3 weisen ein molekulares Gewicht von 30 bzw. 32 kDa auf. Dieses experimentell im Immunblot mit Hilfe von Proteingrößen-Standardmarkern ermittelte Proteingewicht stimmt mit dem theoretisch errechneten Molekulargewicht überein.

Bei diesen *in vitro* Experimenten korreliert die Effizienz der Sekretion mit der Translokationseffizienz. Daraus lässt sich schließen, dass die Fusionsproteine YopE₁₋₁₃₈-KDR2 (pHR584) bzw. YopE₁₋₁₃₈-KDR3 (pHR583) *in vivo* über das T3SS ins Zytosol der Wirtszelle transloziert werden.

Das Hybridprotein YopE₁₋₁₃₈-ec konnte im Immunblot nicht nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass dieses translationale Fusionsprotein zu groß ist, um den im Durchmesser nur ungefähr 28 Angström großen Kanal des T3SS zu durchqueren und in das Zytosol der Wirtszelle zu gelangen. Das Fusionsprotein YopE₁₋₁₃₈-ec enthält zusätzlich zur Translokationsdomäne von YopE die gesamte extrazelluläre Domäne von VEGFR2 (ec). Ein weiterer Grund könnte sein, dass das Fusionsprotein toxisch auf die Salmonellen wirkt.

Der Salmonellenstamm SB824 (pHR584) wurde auf sein Wachstumsverhalten hin analysiert (siehe Abb. 11) und es konnte dabei gezeigt werden, dass der neu konstruierte Stamm dem normalen bakteriellen Wachstumsverlauf aus Anlauf-, exponentieller und stationärer Phase folgte. Aufgrund dieser Erkenntnis konnte ausgeschlossen werden, dass das neu hergestellte und in die Salmonellen transformierte Plasmid pHR584 Auswirkungen auf das Wachstum der Bakterien hatte.

In vivo im C57Bl/6 Mausmodell wurde daraufhin die Kolonisierungskinetik der rekombinanten Salmonellen, die das konstruierte Plasmid pHR584 tragen, in verschiedenen Organen untersucht. Nach der orogastrischen Immunisierung mit SB824 (pHR584) konnten diese Salmonellen bereits an Tag 2 mit CFU/g im Bereich von 10⁶ bis 10⁷ im Dünndarm und in der Milz nachgewiesen werden. Außerdem konnten Salmonellen zu diesem frühen Zeitpunkt in PP, MLN und Dünndarm (SI) gefunden werden. Die bakterielle Last nimmt in den untersuchten Organen kontinuierlich bis Tag 21 ab. An Tag 31 wurden nur noch in den MLN einige Bakterien gefunden.

Im Anfangsstadium der Immunisierung können sich die Salmonellen im Wirtsorganismus stark ausbreiten. Die Mikroorganismen gelangen über den Magen-Darm Trakt in den Dünndarm, wo sie bevorzugt die Epithelzellschicht durchqueren und die Maus systemisch infizieren. Zu Beginn der Infektion werden die Bakterien von Komponenten des angeborenen Immunsystems wie DCs, Makrophagen oder Granulozyten attackiert. Nach dem Ein- und Durchdringen der Epithelschicht erkennen phagozytierende DCs und Makrophagen mit Hilfe "Toll-like Oberflächenmolekülen wie Rezeptoren" (TLRs) von bestimmte Oberflächenstrukturen der Salmonellen wie z.B. LPS und es kommt zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, die eine Entzündungsreaktion in Gang setzen und damit die erworbene Immunantwort initiierten (5;7;9). Die Aktivierung des Komplementsystems kann die Inflammation verstärken und eine Kaskade an proteolytischen Reaktionen auf der Zelloberfläche der Pathogene auslösen. Zu Beginn der Entzündung tragen hauptsächlich Monozyten und Neutrophile zur Zerstörung der Salmonellen bei (154).

Die Tatsache, dass in den PP an Tag 6 keine Salmonellen gefunden wurden, dafür aber an Tag 2 und Tag 14, ist möglicherweise auf einen experimentellen Artefakt zurückzuführen. Eine andere mögliche Erklärung hierfür wäre, dass entlang des Darms eine Vielzahl an PPs zu finden sind, für die Bestimmung der CFU/g aber jeweils nur drei PPs pro Maus analysiert wurden. Dadurch wäre es möglich, dass an Tag 6 exakt jeweils drei solche PPs zufällig ausgewählt wurden, in denen sich in jenem Moment keine Salmonellen befunden haben. Es könnte aber durchaus sein, dass in anderen PPs entlang des Darms zu diesem Zeitpunkt Salmonellen vorhanden waren.

Die erste Phase der bakteriellen Infektion dauert meist nur einige Stunden, wohingegen die zweite Phase mehrere Tage dauern kann. In dieser Zeit erfolgt die intrazelluläre Replikation der Salmonellen, die sowohl in nicht-phagozytischen als auch in phagozytischen Zellen überleben können. Durch die bakterielle Zellteilung steigt die Salmonellenkonzentration in Milz und Leber an (25), wie im Kolonisierungsexperiment durch die bereits erwähnte hohe bakterielle Last an Tag 2 gezeigt werden konnte.

Das bedeutet, dass die genannte zweite Phase der bakteriellen Infektion in diesem Modell früh einsetzte, da die Salmonellen sehr schnell Milz und Leber kolonisierten. Möglicherweise stieg die Anzahl an Salmonellen in Milz und Leber zwischen Tag 2 und Tag 6 nochmals an, sank aber dann wieder rapide ab. Nach dieser Phase der intrazellulären Replikation der Salmonellen könnte es zu einer sekundären Bakterämie kommen und die Mäuse sterben an einem Endotoxin-Schock, falls die Dosis zu hoch ist (>10⁸) (4). Im Kolonisierungsexperiment wurde

S. typhimurium SB824 (pHR584) verwendet. Dieser Stamm ist durch Mutationen in den Genen *aroA* und *sptP* attenuiert und daher weniger pathogen als Wildtypstämme (16). Dies ist der Grund, weshalb die C57Bl/6 Mäuse trotz einer oralen Infektionsdosis von 5 x 10⁸ Salmonellen überlebten und nicht an einem Endotoxin-Schock starben. Die hohe Infektionsdosis steigerte die Infektiosität der attenuierten Salmonellen und schuf damit eine Voraussetzung für eine effiziente Impfung, weil eine ausreichende Anzahl an Bakterien die Epithelzellschicht im Dünndarm durchqueren und die Maus systemisch infizieren konnte. Die Kolonisierung der Milz durch SB824 (pHR584) ist vermutlich günstig für eine effiziente CD8⁺T-Zellinduktion.

In der darauffolgenden Phase der bakteriellen Infektion können die Salmonellen eine bis mehrere Wochen in den Mäusen persistieren. Die Bakterienanzahl erreicht ein Plateaulevel und sank dann konstant ab. Diese kontinuierliche Abnahme der CFU/g in den untersuchten Organen wurde auch für SB824 (pHR584) in der Kolonisierungskinetik (siehe Abb. 12) gezeigt. Ein weiteres Charakteristikum dieser Persistenzphase ist die Splenomegalie. Dieses Symptom der vergrößerten Milz wurde auch in den infizierten Mäusen im Kolonisierungsversuch an Tag 6 und Tag 14 festgestellt. Nach dreiwöchiger Infektion mit SB824 (pHR584) waren nur noch in den MLN Salmonellen zu finden. Zu diesem Zeitpunkt hatten die C57BI/6 Mäuse eine erworbene Immunantwort gegen die Bakterien entwickelt und konnten diese aus dem Organismus allmählich eliminieren, sowie eine Langzeitimmunität gegen diese Spezies erwerben (25). Bis Tag 31 konnten auch die letzten in den MLN verbliebenen Salmonellen von den Komponenten des erworbenen Immunsystems bekämpft und eliminiert werden. Die erworbene Immunantwort gegen *S. typhimurium* beinhaltet sowohl eine B- als auch eine T-Zellantwort. Für die Kontrolle einer *S. typhimurium* Infektion ist eine effektive CD4⁺ und CD8⁺T-Zellantwort essentiell (155).

Nach der Untersuchung der Kolonisierungskinetik von SB824 (pHR584) wurde die Induktion einer spezifischen CD8⁺T-Zellantwort durch diesen neuartigen Salmonellenstamm evaluiert. In zahlreichen Studien zur immuntherapeutischen Anti-Angiogenese wurde gezeigt, dass CD8⁺T-Zellen für den Anti-Tumor-Effekt in Mausmodellen verantwortlich waren (96;109;110;151). Unabhängig von der Immunisierungsmethode hatte die experimentelle Depletion der CD8⁺T-Zellen in diesen Studien die Aufhebung des Anti-Tumor-Effekts im Mausmodell zur Folge. Niethammer und Kollegen konnten darüberhinaus durch IF-Aufnahmen von Lungenmetastasen in Mäusen zeigen, dass CD8⁺T-Zellen vermehrt im

Tumorendothelium zu finden waren, falls die Mäuse präventiv mit einer DNA-Vakzine gegen VEGFR2 behandelt wurden (96).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass SB824 (pHR584) nach orogastrischer Immunisierung in C57Bl/6 Mäusen die Induktion einer KDR2₄₀₀₋₄₀₈-spezifischen CD8⁺T-Zellantwort auslöste. Die Induktion der spezifischen CD8⁺T-Zellantwort konnte durch Oberflächen- (CD8) und spezifische Tetramerfärbung (KDR2) von Milzzellen sowie FACS-Analyse in den Tagen und Wochen nach der orogastrischen Infektion gezeigt werden (siehe Abb. 15). Nach dem Durchqueren des Darmepithels konnten die Salmonellen in phagozytischen und nicht-phagozytischen Zellen in einer SCV persistieren. Mit Hilfe des konstitutiv aktiven *lac*-Promotors und des T3SS wurde das Hybridprotein YopE₁₋₁₃₈-KDR2 synthetisiert und ins Zytosol von APCs transloziert, dort auf dem MHC I-Antigenpräsentationsweg prozessiert und auf der Zelloberfläche auf MHC I Molekülen CD8⁺T-Zellen präsentiert (siehe Abb. 27). Diese erkennen mit ihrem TCR den Komplex aus MHC I und immunogenem Epitop KDR2, das durch die Prozessierung im Proteasom entstand und im ER auf das MHC I-Molekül geladen wurde.



Abb. 27 Salmonellen T3SS-vermittelte Generierung von KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen. YopE₁₋₁₃₈-KDR2-Fusionsproteine werden mittels T3SS in das Zytosol von APCs sekretiert, über den MHC Klasse I – Antigenpräsentationsweg prozessiert und von naiven CD8⁺T-Zellen mit dem passenden TCR erkannt. Diese werden dadurch aktiviert und proliferieren.

Die Bindung des TCR an den Peptid-MHC-Komplex (pMHC) löst eine Signalkaskade in der CD8⁺T-Zelle aus, die zur Aktivierung der naiven T-Zelle führt.

CD8⁺T-Zellen haben die Aufgabe, infizierte oder entartete Zellen abzutöten und werden daher auch als zytotoxische T-Zellen (CTLs) bezeichnet. Naive CD8⁺T-Zellen suchen in den sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, PP) nach infizierten oder entarteten Zellen. Die Aktivierung der zytotoxischen T-Zelle durch die Antigenbindung und Kostimulation führt schließlich zur Zellteilung, sodass Tochterzellen mit identischem TCR entstehen. Eine erfolgreiche Antigenpräsentation ist für die Generierung einer antigenspezifischen CD8⁺T-Zellantwort ausschlaggebend (156).

Die Kinetik der KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellantwort in C57Bl/6 Mäusen nach orogastrischer Immunisierung mit SB824 (pHR584) wurde über einen Zeitraum von 31 Tagen verfolgt (siehe Abb. 15). Die Auswertung der Daten aus dem Durchflusszytometer (FACS) erfolgte so, dass zusammenklebende und tote bzw. apoptotische Zellen ausgeschlossen wurden und nur CD8-positive Lymphozyten auf das Vorhandensein des TCR für das KDR2-Epitop untersucht wurden (siehe Abb. 14). Durch dieses Vorgehen konnten unspezifische Bindungen und falsch-positive Ergebnisse weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die am jeweiligen Tag ermittelte Prozentzahl an KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen wurde als relative Prozentzahl angegeben (Abb. 15). Der Grund hierfür war, dass sich an den jeweiligen Versuchstagen verschiedene Werte für die Kontrolle, also für Lymphozyten aus naiven, nichtimmunisierten Kontrollmäusen ergaben. Diese Kontrollwerte stellten die prozentualen Anteile an CD8⁺T-Zellen dar, an die das KDR2-spezifische Tetramer unspezifisch gebunden hatte. Um die verschiedenen Zeitpunkte besser vergleichen zu können, wurden die Kontrollwerte auf ein fixes Niveau normalisiert und die Daten aus den immunisierten Mäusen entsprechend behandelt und angeglichen. Dadurch ergaben sich diese relativen Prozentzahlen.

Auf den ersten Blick fällt auf, dass die absoluten Prozentzahlen der spezifischen Immunzellen sehr gering erscheinen, da nur 0,1% bis 0,36% der gesamten CD8⁺T-Zellpopulation als spezifisch für KDR2 bestimmt wurden (Abb. 15). Nichtsdestotrotz konnte an den Zeitpunkten Tag 6, Tag 14 und Tag 21 ein signifikanter Unterschied zu Mäusen der Kontrollgruppe festgestellt werden.

Die spezifische Immunantwort war sechs Tage nach der orogastrischen Immunisierung der C57Bl/6 Mäuse am stärksten ausgeprägt, d.h. die Antigenpräsentation und Aktivierung der naiven CD8⁺T-Zellen hatte zu diesem Zeitpunkt bereits stattgefunden. Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl an KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen kontinuierlich ab. An Tag 31 war zwar kein signifikanter Unterschied zu Mäusen der Kontrollgruppe mehr feststellbar, aber es wäre trotzdem möglich gewesen, dass KDR2-spezifische CD8⁺T-Zellen unter der

methodischen Nachweisgrenze lagen. In diesem Experiment wurden nur Lymphozyten aus der Milz untersucht und daher könnten in anderen Organen wie PP oder MLN durchaus noch spezifische CD8⁺T-Zellen vorhanden gewesen sein. Beim Blick auf die Kolonisierungsdaten von SB824 (pHR584) fällt auf, dass die MLN am längsten von den Bakterien kolonisiert waren und daher könnte in diesem sekundären lymphatischen Organ auch an späten Zeitpunkten eine Translokation des Hybridproteins via T3SS der Salmonellen und anschließender Antigenpräsentation stattgefunden haben. Um auch sehr geringe T-Zellantworten messen zu können, fehlt ein äußerst sensitives System.

Im Parallelexperiment konnte gezeigt werden, dass eine Booster-Immunisierung mit *S. dublin* BRD620 (pHR584) die bereits bestehende KDR2-spezifische CD8⁺T-Zellantwort steigern konnte. Sieben Tage nach der Zweitimmunisierung war dieser Wert signifikant größer als der Kontrollwert und größer als der Wert an Tag 21 nach einmaliger Immunisierung, wenn auch nicht signifikant. Zwei Wochen danach war keine Signifikanz zu Mäusen der Kontrollgruppe mehr feststellbar. Durch die orogastrische Immunisierung mit BRD620 (pHR584) kommt es erneut zur Translokation des Hybridproteins YopE₁₋₁₃₈-KDR2 in das Zytosol von APCs und nachfolgend zur MHC-Klasse I-Antigenpräsentation, wodurch die Generierung KDR2-spezifischer CD8⁺T-Zellen erneut induziert wird. Diese Strategie einer primären Immunisierung mit SB824 (pHR584) und einer Wiederholungsimmunisierung mit BRD620 (pHR584) wurde auch für die präventive Immunisierung in den Tumorexperimenten angewendet, um eine maximale spezifische Immunation vort gegen VEGFR2 zu erzielen.

Ein anderer Versuch, die Quantität der KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen zu erhöhen, war die Kombinationsimmunisierung von SB824 (pHR584) zusammen mit KDR2-Peptid und CpG-Oligonukleotiden. Berchtold und Kollegen hatten in BALB/c Mäusen mit dem Modellantigen p60 gezeigt, dass die sequentielle Immunisierung mit Salmonellen, die das Hybridprotein YopE₁₋₁₃₈-p60 synthetisieren und p60-Peptid sowie CpG-Oligonukleotiden zu einer signifikanten Erhöhung der Zahl an p60-spezifischen CD8⁺T-Zellen führte. CpG-Oligonukleotide sind gebräuchliche Adjuvantien, die vom angeborenen Immunsystem durch TLR9 erkannt werden und zu einer starken Immunantwort, sowie einer Steigerung der Immunantwort gegen zusätzlich verabreichte Peptide führen können (138). Der Anteil an p60-spezifischen CD8⁺T-Zellen konnte durch diese Kombinationsimmunisierung von 5% auf über 25% gesteigert werden.

Diese Steigerung der spezifischen Immunantwort mittels Kombinationsimmunisierung konnte jedoch mit SB824 (pHR584) und CpG sowie KDR2₄₀₀₋₄₀₈-Peptid nicht erreicht werden.

Obwohl auch das Hybridprotein YopE₁₋₁₃₈-KDR2, genauso wie YopE₁₋₁₃₈-p60 über das T3SS von Salmonellen in das Zytosol von APCs transloziert wurde und zu einer spezifischen CD8⁺T-Zellantwort führte, hatte die zusätzliche TLR9 Stimulierung bei SB824 (pHR584) keinen Effekt auf die spezifische CD8⁺T-Zellantwort. Im Vergleich zum p60-Modellantigen, bei dem auch bei einfacher orogastrischer Immunisierung nur mit Salmonellen viel höhere prozentuale spezifische CD8⁺T-Zellantworten erreicht wurden, wurde in dieser Arbeit das KDR2-Epitop von VEGFR2 als Antigen verwendet. VEGFR2 ist ein Selbstantigen und möglicherweise war dies der Grund, warum im Gegensatz zum Listerienantigen p60 keine Expansion der spezifischen CD8⁺T-Zellantwort erreicht werden konnte, wenn eine Kombinationsimmunisierung mit CpG-Oligonukleotiden durchgeführt wurde. Die molekularen Details dieser Erkenntnis sind nicht bekannt und bedürfen weiterer Untersuchungen. Im Falle der in dieser Studie verwendeten Tumorvakzinierung gegen VEGFR2 mittels Salmonellen handelt es sich bei dem Antigen um einen körpereigenes Protein des Wirts, das zwar hauptsächlich im Embryonalstadium produziert wird, aber auch bei der Tumorvaskularisierung vermehrt synthetisiert wird. Durch das Auftreten von spezifischen T-Zellen gegen VEGFR2 wurde durch die Salmonellen-vermittelte Vakzinierung die periphere Toleranz gegen Selbstantigene durchbrochen. Möglicherweise wurde die Induktion von spezifischen CD8⁺T-Zellen gegen VEGFR2 aber teilweise unterdrückt, um eine Autoimmunreaktion zu verhindern. Dies würde auch die geringe Immunogenität von VEGFR2 bzw. dessen Epitopen KDR2 und KDR3 erklären. Die schwache Immunogenität spiegelte sich in der Bildung einer geringen Anzahl an spezifischen CD8⁺T-Zellen (0,05% bis 0,5%, siehe Abb. 15) im Vergleich zu einem "körperfremden" Antigen, wie beispielsweise dem Listerienantigen p60 (2% bis 10%) (137), wider. Auch in der ursprünglichen Beschreibung von KDR2 und KDR3 als immunogene Epitope von VEGFR2 wurde diese schwache Immunogenität durch die geringe Prozentzahl an KDR2- bzw. KDR3-positiven CD8⁺T-Zellen nach einer Peptidvakzinierung beschrieben. Dabei konnte die Zahl an Epitopspezifischen CD8⁺T-Zellen durch eine *in vitro* Restimulation mit den entsprechenden Peptiden auf ca. 1% an spezifischen CD8⁺T-Zellen deutlich gesteigert werden (80).

Neben dem Unterschied im Antigen wurde auch im C57Bl/6 statt wie bei p60 im BALB/c Mausmodell gearbeitet. Ein weiterer möglicher Grund für die allgemein geringere Immunantwort mit KDR2 als Antigen wäre eine geringere Effizienz in der Proteinsynthese und -sekretion, die im Western Blot durch die etwa gleich stark ausgeprägten Proteinbanden von YopE₁₋₁₃₈-KDR2 und YopE₁₋₁₃₈-p60 bei identischer Menge an eingesetzter

97

Bakterienkultur aber nicht nachzuweisen war (siehe Abb. 10). Eine schwächere Expression des Hybridproteins YopE₁₋₁₃₈-KDR2 *in vivo* würde eine geringere Translokation in das Zytosol von APCs zur Folge haben, wodurch weniger Protein bzw. Antigen prozessiert und präsentiert werden könnte. Ein anderer Grund für die quantitativen Unterschiede in der Immunantwort könnte eine mangelhafte oder unvorteilhafte Faltung des Fusionsproteins YopE₁₋₁₃₈-KDR2 im Vergleich zu YopE₁₋₁₃₈-p60 sein, wodurch die MHC Klasse I-Antigenpräsentation beeinträchtigt werden könnte.

Dong und Kollegen beschrieben die immunogenen Epitope KDR2 und KDR3 von VEGFR2 erstmals und konnten zeigen, dass KDR2- und KDR3-Tetramere an CTLs binden, die durch Peptidimmunisierung mit KDR2- bzw. KDR3-Peptid in C57Bl/6 Mäusen induziert wurden. Die Tetramerfärbung nach der Peptidimmunisierung ergab 0,06% KDR2-spezifische und 0,04% KDR3-spezifische CD8⁺T-Zellen (80). Diese geringen CD8⁺T-Zellantworten konnten auch durch die hier erstmals angewendete Salmonellen T3SS-vermittelte Vakzinierung gegen VEGFR2 erzielt werden. In Übereinstimmung mit Dong und Kollegen wurde ebenfalls KDR2 als immunogeneres Antigen identifiziert, weil damit höhere CD8⁺T-Zellantworten in den C57Bl/6 Mäusen induziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte im Western Blot gezeigt werden, dass das YopE₁₋₁₃₈-KDR3-Fusionsprotein eine schwächere Sekretionseffizienz aufweist als YopE₁₋₁₃₈-KDR2, da die detektierte Proteinbande nur halb so stark ausgeprägt war.

Im Gegensatz zu den Versuchen von Dong und Kollegen ergab die Immunisierung von C57Bl/6 Mäusen in der vorliegenden Arbeit mit CpG und KDR2-Peptid keine signifikante KDR2-spezifische CD8⁺T-Zellantwort (siehe Abb. 19). Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die unterschiedliche Zusammensetzung der Vakzine. Während in dieser Arbeit nur mit CpG in Kombination mit dem KDR2-Peptid immunisiert wurde, setzten Dong und Kollegen noch weitere Faktoren wie GM-CSF, Freund's Adjuvans und anti-CD40-Antikörper ein.

Neben der Kinetik der induzierten KDR2-spezifischen Immunantwort wurde auch die Qualität dieser T-Zellantwort durch die Quantifizierung der CD8⁺T-Zellsubtypen untersucht.

Ein Vorteil der Salmonellen-vermittelten Vakzinierungsstrategie gegenüber der Verabreichung von monoklonalen Antikörpern gegen Faktoren des VEGF/VEGFR2-Signalweges ist die Generierung von langlebigen Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Auftreten eines Tumors zu einem späteren Zeitpunkt wieder aktiviert werden können und die Tumorvaskularisierung reduzieren bzw. blockieren können. Nach dem Absetzen der

Antikörper tritt die Revaskularisierung im Mausmodell innerhalb von sieben Tagen auf (139). Außerdem ist die unter Umständen langwierige Therapie mit Antikörpern sehr viel kostenintensiver als die Verabreichung von bakteriellen Lebendimpfstoffträgern.

Durch die Antigenbindung am TCR und die Kostimulation kommt es zur Aktivierung der CTL und dadurch zur erhöhten Bildung von IL-2 und der α -Kette des IL-2 Rezeptors (IL-2R α). Eine Bindung von IL-2 an den nun vollständigen IL-2 Rezeptor (IL-2R) lässt die CTL in den Zellzyklus eintreten und die spezifische CD8⁺T-Zelle differenziert über mehrere Tage hinweg zu theoretisch mehreren Tausend bis Zehntausend CD8⁺T-Effektorzellen mit identischem Antigenrezeptor (157-159). Außer den Effektorzellen werden auch Gedächtniszellen gebildet. Die Programmierung von naiven T-Zellen zur Entwicklung zu Gedächtnis T-Zellen geschieht sehr früh während der primären Immunantwort. Schon 24 h Antigenstimulation sind ausreichend, um die Vorgänge der klonalen Expansion, Ausübung der Effektorfunktion und Differenzierung in Gedächtniszellen zu induzieren (160;161).

Die Effektorzellen, die für eine schnelle spezifische Immunantwort verantwortlich sind, migrieren zum Ort der Zielzellen, die den entsprechenden pMHC I-Komplex tragen und eliminieren diese. Für die Effektivität einer Immunantwort gegen Infektionserreger oder Tumore ist nicht nur die spezifische Immunantwort an sich wichtig, sondern auch die Qualität dieser spezifischen CD8⁺T-Zellantwort. Antigen-spezifische T-Zellen lassen sich in mindestens drei verschiedene Subpopulationen einteilen (162). EC zeichnen sich durch schnelle Effektorfunktion, schwache Proliferation und eine begrenzte Lebensdauer in vivo aus. Gedächtnis T-Zellen hingegen persistieren aufgrund der Antigen-unabhängigen homöostatischen Erneuerung über einen längeren Zeitraum. CMC sind bevorzugt in Lymphorganen zu finden, besitzen aber keine unmittelbare Effektorfunktion, wohingegen EMC vor Allem in nicht-lymphatischen Geweben zirkulieren und nach Antigenkontakt eine sofortige Effektorfunktion zeigen (161). Aktuelle Ergebnisse zeigen deutlich, dass unter anderem die Expression des Oberflächenmarkers CD127 für die Existenz Antigen-spezifischer CD8⁺T-Zellen als langlebige Gedächtniszellen eine wichtige Rolle spielt (163).

Die Bildung dieser Subpopulationen wurde durch die orale Immunisierung mit SB824 (pHR584) induziert. Zu frühen Zeitpunkten der Infektion mit Salmonellen dominiert die Population der Effektorzellen unter den KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen in der Milz. Über 60% dieser antigenspezifischen Lymphozyten werden an Tag 6 nach der oralen Salmonellenimmunisierung anhand von Oberflächenmolekülen als Effektor CD8⁺T-Zellen (EC) identifiziert. Im Laufe der Infektion nimmt der Anteil an Gedächtnis T-Zellen (EMC und

CMC) zu, wohingegen die Effektorzellen prozentual abnehmen (siehe Abb. 17). In der sog. Kontraktionsphase der T-Zellen werden ca. 90% der Effektor CD8⁺T-Zellen durch verschiedene Apoptose-Mechanismen eliminiert.

Die Kontraktionsphase korreliert meistens mit der Eliminierung der Salmonellen. Diese Beobachtung traf auch für die Immunisierung mit SB824 (pHR584) zu, da zwischen Tag 14 und Tag 21 nahezu alle Bakterien eliminiert wurden und andererseits der prozentuale Anteil an Effektorzellen ab Tag 6 kontinuierlich abnahm. Von Tag 6 nach Tag 14 nahm dieser Anteil beispielsweise von 60% auf 20% ab (siehe Abb. 17). Diejenigen T-Zellen, die die Kontraktionsphase überleben, sind langlebige Gedächtnis-T-Zellen, die ihre Antigenspezifität beibehalten und deren Anzahl im Wirtsorganismus durch fortwährende Proliferation konstant gehalten wird (164;165). Diese Gedächtnis-T-Zellen sind entweder schnell proliferierende CMC oder EMC, die sich durch eine rasche Effektorfunktion auszeichnen. Die Gedächtnis-T-Zellen können durch das erneute Auffinden des entsprechenden Antigens umgehend aktiviert werden, was zur schnellen Proliferation von Antigen-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen und Expansion zu EC führt und dadurch zum Schutz vor einer erneuten Infektion mit einem bestimmten Erreger (166). Die Details dieser Proliferation und Expansion der Gedächtnis-T-Zellen nach einer Reinfektion sind noch nicht bekannt.

Die Effizienz der hier vorgestellten Salmonellen-vermittelten Vakzinierung gegen VEGFR2 wurde sowohl in einem Flankentumorexperiment als auch in einem künstlichen Metastasierungsmodell mit Melanomen evaluiert.

Im Flankentumorexperiment konnte durch Fluoreszenz-Mikroskopie gezeigt werden, dass C57Bl/6 Mäuse, die präventiv mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisiert wurden und dadurch eine spezifische CD8⁺T-Zellantwort gegen VEGFR2 zeigten, signifikant weniger Endothelzellen im B16F10-Melanom aufwiesen als Kontrollmäuse. Letztere wurden nicht immunisiert bzw. nur mit Salmonellen immunisiert, die kein Plasmid pHR584 trugen (SB824) und somit keine Immunantwort gegen VEGFR2 induzieren konnten. Die Reduktion der Endothelzellen in den Tumoren der immunisierten Mäuse wurde durch die Immunfluoreszenzfärbung von Tumorschnitten mit einem Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 eindeutig nachgewiesen (Abb. 21). Die durchschnittliche Fläche der CD31-FITC-Fluoreszenz war in den Melanomen der mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisierten Mäuse um ca. 62% reduziert im Vergleich zu Kontrolltieren. Die oben gezeigte Induktion von KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen durch die Immunisierung mit

SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) ließ den Schluss zu, dass diese CTLs die VEGFR2positiven Endothelzellen im Tumor gezielt eliminierten und dadurch die Tumorangiogenese abgeschwächt wurde.

Dong und Kollegen haben mit Hilfe von ⁵¹Cr-Release Assays gezeigt, dass CTLs, die durch die Vakzinierung mit KDR2- und KDR3-Peptiden induziert wurden, in vitro die VEGFR2exprimierende Endothelzelllinie H5V lysieren können. Des Weiteren zeigten sie durch photometrische Messung des Hämoglobingehalts in Matrigel Assays, dass die Vakzinierung mit KDR2- und KDR3-Peptiden die Angiogenese in vivo um ca. 70% reduzierte (80). Dabei diente der pro-angiogene VEGF als Wachstumsfaktor für die Neovaskularisierung. Der Vergleich der Vakzinierungsstrategien zeigt, dass die Salmonellen T3SS-vermittelte Vakzinierung gegen VEGFR2 eine ähnliche Effizienz bezüglich der Inhibierung der Angiogenese hat wie die Peptidimmunisierung mit KDR2- und KDR3-Peptiden. Niethammer und Kollegen zeigten diesen anti-angiogenen Effekt ursprünglich mit einer DNA-Vakzinierung gegen VEGFR2 und konnten ebenfalls eine Reduktion der Angiogenese um ca. 70% nachweisen, indem sie ihre Vakzinierungsmethode sowohl im Matrigel Assay als auch durch IF-Messung mit Hilfe eines fluoreszent markierten CD31-Antikörpers in Kolonkarzinom-Metastasen daraufhin testeten (96). Eine andere Gruppe zeigte, dass die Vakzinierung mit VEGFR2-Protein gepulsten DCs die Angiogenese in Lungenkarzinomen um ca. 65% reduzierte. Dabei wurde Fluorochrom-markiertes Dextran, das i.v. in die Mäuse appliziert wurde und Blutgefäße markiert (109), im Tumorendothel quantifiziert.

In Abb. 28 ist die spezifische Lyse von VEGFR2-positiven Endothelzellen im Tumor modellhaft dargestellt. CTLs erkennen spezifisch das KDR2-Epitop des VEGFR2 auf Endothelzellen und es kommt zur zytotoxischen Lyse der Zielzelle durch Perforine und Granzyme bzw. durch den FasL/Fas-Rezeptor Weg. In beiden Fällen werden Caspasen in der Zielzelle aktiviert, die zur Induktion der Apoptose führen (167).

Es ist anzunehmen, dass die spezifischen CTLs sowohl VEGFR2-positive Endothelzellen im Tumor, als auch proliferierende Endothelzellen in der Blutbahn lysieren, die für die zytotoxischen CD8⁺T-Zellen sehr gut zugänglich sind. Es gibt keine Erkenntnisse über die Expression von VEGFR2 in B16F10-Melanomzellen, deshalb zerstören die KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen vorrangig die Tumor-assoziierten Endothelzellen, die VEGFR2 exprimieren.



Abb. 28 Modell der spezifischen Lyse von VEGFR2-positiven Endothelzellen durch KDR2-spezifische CD8⁺T-Zellen. Tumor-assoziierte Endothelzellen, die VEGFR2 exprimieren, werden von KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen erkannt und lysiert, die durch Immunisierung mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) induziert wurden.

Durch die Eliminierung der VEGFR2-exprimierenden Endothelzellen ist ein wesentlicher Mechanismus in der Etablierung von Tumoren gestört. Die Blutgefäße sorgen normalerweise für die Versorgung der Tumore mit Nährstoffen und Sauerstoff. Folkman hat in zahlreichen Studien gezeigt, dass die Angiogenese ein essentieller Mechanismus für das Wachstum von Tumoren über eine minimale Größe hinaus ist (77;168). In Abb. 29 ist diese These in einem Modell dargestellt. Der pro-angiogene Faktor VEGF wird von Tumoren produziert, bindet an VEGFR2 auf proliferierenden Endothelzellen und induziert dadurch die Bildung neuer Blutgefäße.

Interessanterweise ist die Bildung neuer Blutgefäße nicht nur für die Versorgung von Tumoren wichtig, sondern wirkt auch wachstumsfördernd auf Tumorzellen. Durch die parakrine Sezernierung von Wachstumsfaktoren wie PDGF und Zytokinen wie beispielsweise IL-1, IL-6 und IL-8 stimulieren Endothelzellen das Wachstum von Tumorzellen. Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen auch entlang von Endothelgefäßen wachsen, wenn darin kein Blut vorhanden war (91). Es liegt demnach zwischen den Tumor- und Endothelzellen eine gegenseitige parakrine Stimulation vor. Die Zerstörung der VEGFR2-positiven Endothelzellen verhinderte somit neben der Tumorversorgung auch indirekt die Bildung von wachstumsfördernden Molekülen für den Melanom-Flankentumor.



Abb. 29 Prinzip der Tumorangiogenese. Die Tumorangiogenese ist eine Grundvoraussetzung für das Wachstum von Tumoren über eine Größe von 2 bis 3 mm hinaus. Durch die Produktion von VEGF und die vermehrte Synthese von VEGFR2 auf Endothelzellen wird das Wachstum von Blutgefäßen induziert, die den Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen. Dadurch kommt es zum Wachstum des Tumors.

Folkman's These konnte auch im Flankentumorexperiment nach präventiver Salmonellen T3SS-vermittelter Immunisierung gegen VEGFR2 bestätigt werden. Als murine Tumorzelllinie wurde das B16F10-Melanom gewählt. Diese Tumorzellen zeichnen sich durch ihre schwache Immunogenität aufgrund starker Immunevasionsmechanismen im Vergleich zu anderen Tumorzelllinien aus (117). In der Gruppe von Mäusen, die präventiv mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisiert wurde, wuchsen die Tumore im Durchschnitt langsamer als in den Mäusen der Kontrollgruppen. Es konnte eine 50%ige Reduktion des Tumorwachstum in den immunisierten Mäusen gezeigt werden. Außerdem waren bis Tag 42 des Experiments, also bis 12 Tage nach der Applikation des Tumors, 10% der immunisierten Mäuse frei von Tumoren.

Durch die fehlende Ausbildung von neuen Blutgefäßen im Tumor konnten die Tumorzellen nicht mit ausreichend Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden und daher auch nicht proliferieren. Im Flankentumormodell lysierten die KDR2-spezifischen CD8⁺T-Zellen in den mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisierten Mäusen die Tumor-assoziierten Endothelzellen, die VEGFR2 auf der Zelloberfläche exprimierten (siehe Abb. 28). Dadurch

kam es zum inhibierten bzw. verlangsamten Wachstum der injizierten B16F10-Melanomzellen.

Im Vergleich zur präventiven DNA-Vakzinierung gegen VEGFR2 von Niethammer, die das Wachstum von B16F10-Melanomen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen um ca. 75% reduzierte (96), konnte mit der hier gezeigten präventiven Salmonellen-vermittelten Tumorvakzinierung gegen VEGFR2 eine Reduktion des B16F10-Melanomwachstums um 50% erreicht werden. Dong und Kollegen erreichten durch die Vakzinierung mit KDR2- und KDR3-Peptiden in einem therapeutischen Ansatz ebenfalls eine 50% ige Reduktion des Wachstums von Kolonkarzinomen in einem murinen Flankentumormodell (80). Der Vergleich der verschiedenen Tumorimmuntherapien lässt den Schluss zu, dass die Effizienz von Salmonellen-vermittelter Vakzinierung und Peptidvakzinierung gegen VEGFR2 gleich ist, auch wenn verschiedene Tumorarten in den beiden Studien angewendet wurden. Demnach wäre die Methode der DNA-Vakzinierung gegen VEGFR2 die effizienteste der drei Strategien. Um genauere Vergleiche anstellen zu können, müssten die verschiedenen Immunisierungsstrategien aber unter identischen Versuchsbedingungen untersucht werden.

Das künstliche Metastasierungsmodell diente neben dem Flankentumormodell als weiteres Modell für die Evaluierung der Effizienz der Salmonellen-gesteuerten Vakzinierung gegen VEGFR2. Beim Metastasierungsmodell liegt das Hauptaugenmerk nicht auf der Therapie eines primären Tumors, sondern auf dem Verhindern von Sekundärtumoren durch Metastasen. Auch bei dieser Manifestierung von Tumorzellen, die sich von Primärtumoren ablösen und via Lymphe und Blut an möglicherweise weit entfernte Stellen im Körper transportiert werden, spielt die Tumorangiogenese eine wichtige Rolle (99). Die Blockierung der Aktivität von VEGF-A oder der Funktion seiner Rezeptoren (z.B. VEGFR2) hat in zahlreichen Tier-Tumormodellen neben der Reduktion des Tumorwachstums auch die Reduktion bzw. das Verhindern der Metastasierung zur Folge gehabt (85;101;102;169). Bei Kindern, die an soliden, bösartigen Tumoren leiden, hat man festgestellt, dass hohe Level an zirkulierenden VEGFR2-positiven Endothelvorläuferzellen mit der Bildung von Metastasen korrelieren (170).

Die durch SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) induzierte KDR2-spezifische CD8⁺T-Zellantwort führt zur Reduktion der Tumorangiogenese, indem die CTLs VEGFR2exprimierende Endothelzellen angreifen und lysieren. Dies konnte im Flankentumormodell mit dem B16F10-Melanom gezeigt werden. Es ist anzunehmen, dass auch im künstlichen

Metastasierungsmodell die Tumorangiogenese reduziert war, da die Mäuse ebenfalls präventiv mit SB824 (pHR584) und BRD620 (pHR584) immunisiert wurden und dieselbe Tumorzelllinie verwendet wurde. Die reduzierte Tumorangiogenese dürfte daher der Grund dafür gewesen sein, dass in den Lungen immunisierter Mäuse deutlich weniger Metastasen festgestellt wurden als bei Kontrollmäusen, die nicht immunisiert wurden.

Die Arbeitsgruppe um Yiwen Li wies durch die Vakzinierung mit VEGFR2-Peptid gepulsten DCs eine um 85% reduzierte Metastasierung von B16F10-Melanomzellen in Mäuselungen nach (109). Diese Vakzinierungsstrategie ergab für ein anderes Lungenkarzinommodell sogar eine über 90%ige Reduktion der Metastasierung in den immunisierten Mäusen. Dabei wurden Lungenkarzinomzellen in den "footpad" von Mäusen injiziert und die entstehenden Tumore chirurgisch entfernt, als sie eine Größe von 5 mm im Durchmesser erreicht hatten. Die Metastasierung wurde durch Zählen der Metastasen in den Lungen der Mäuse gemessen (109). Dieselbe Methode der Tumorapplikation wurde von Niethammer angewendet, um die präventive DNA-Vakzinierung gegen VEGFR2 zu evaluieren. Die auf einem Plasmid kodierte DNA von VEGFR2 wurde mit Hilfe von rekombinanten Salmonellen als Vehikel in die Mäuse appliziert, um die präventive Vakzinierung durchzuführen. Durch diese Methode waren die Lungenflächen der immunisierten Mäuse im Durchschnitt zu weniger als 20% von Metastasen bedeckt, während in nicht immunisierten Mäusen der Kontrollgruppe die Lungen zu mehr als 50% von Metastasen der Lungenkrebszellen durchsetzt waren.

Die Anwendung der Salmonellen T3SS-gesteuerten Vakzinierung gegen VEGFR2 erbrachte im künstlichen Metastasierungsmodell sehr ähnliche Ergebnisse, da die Anzahl an Metastasen durch die Vakzinierung um 60% reduziert werden konnte. Betrachtete man die von punktförmig schwarzen Metastasen bedeckte Fläche auf den Lungen der Mäuse, so war bei den naiven Mäusen im Durchschnitt fast 90% der Lunge mit gestreuten Melanomzellen besetzt, wohingegen bei den immunisierten Mäusen nur 35% der Fläche bedeckt war.

Beim Vergleich der verschiedenen Tumorimmuntherapien zur Inhibierung der Metastasenbildung ist die Effizienz der Vakzinierung mit DCs, die mit VEGFR2-Peptid gepulst sind, am größten. Die Methode der DNA-Vakzinierung und die in dieser Arbeit vorgestellte Vakzinierung mittels Salmonellen sind ebenfalls effiziente Strategien, um eine Tumormetastasierung zu unterdrücken. Um genauere Vergleiche anstellen zu können, müssten auch bei diesem Modell die verschiedenen Immunisierungsstrategien unter identischen Versuchsbedingungen untersucht werden.

105

Der Unterschied in der Anzahl der Sekundärtumore und der Lungenfläche, die von Metastasen bedeckt war, erklärte auch das äußere Erscheinungsbild der Versuchsmäuse beim künstlichen Metastasierungsmodell. Die naiven Mäuse, deren Lungen fast vollständig von den Metastasen durchsetzt waren, wiesen eine gekrümmte Körperhaltung und ein geringeres Körpervolumen bzw. zum Ende des Experiments hin eine geringe Körpergröße auf. Diese Symptome ließen sich auf die reduzierte Funktionsfähigkeit der Lungen durch die starke Metastasierung zurückführen.

Durch die geringe Tumorangiogenese können sich gestreute Tumorzellen nur schwer in dem Lungengewebe niederlassen und etablieren, sowie einen Sekundärtumor bilden. Laut Folkman ist die Tumorangiogenese notwendig, damit Tumore über eine minimale Größe von 2-3 mm hinaus wachsen können. Die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung via Diffusion funktioniert nur über einige mm (77;168) und muss darüber hinaus durch Angiogenese erfolgen. Bei der Metastasierung müssen sich Tumorzellen, die sich vom Primärtumor ablösen, an der Stelle des Sekundärtumors etablieren und proliferieren. Dabei ist die Neubildung von Blutgefäßen, die Neoangiogenese, essentiell für die Etablierung und Proliferation der Metastasen.

Die Angiogenese ist ausschlaggebend für die Verwandlung von Mikrometastasen in makroskopische Metastasen (99;100). Ohne ausreichende Angiogenese bilden sich "schlafende" Mikrometastasen (100). Es ist anzunehmen, dass dies auch im künstlichen Metastasierungsmodell auf den Lungen der immunisierten Mäuse der Fall war. Dort, wo die gestreuten Melanomzellen versuchen, zu adhärieren und eine Metastase zu bilden, ist die Apoptose der dominante Mechanismus über die Proliferation und die Etablierung einer Metastase wird verhindert.

In den nicht immunisierten bzw. nur mit SB824 immunisierten Mäusen blockierte der Prozess der Angiogenese die Apoptose (83;171) und es kam zur Proliferation der gestreuten Melanomzellen sowie zur Ausbildung eines Sekundärtumors, der im künstlichen Metastasierungsmodell durch die Lungenmetastasen imitiert wurde und im Experiment durch die Metastaenbildung in den Mäuselungen deutlich gezeigt wurde.

Wie durch die Evaluierung im Flankentumor- und im künstlichen Metastasierungsmodell aufgezeigt werden konnte, ist die hier vorgestellte Salmonellen-vermittelte Vakzinierungsstrategie gegen VEGFR2 eine effiziente Alternative zu Impfmethoden wie DNA- oder Peptidvakzinierung.

Neben dem Gebrauch als Lebendimpfstoffträger in Tiermodellen wurden Salmonellen bereits in Krebspatienten in klinischen Studien als Vehikel für Chemotherapeutika angewendet (172;173) und es wird auch weiterhin an der Verbesserung der Salmonellenstämme gearbeitet, die in humanen Krebsstudien als lebende Impfstoffträger zum Einsatz kommen sollen (174).

In dem vorgestellten Modell der Salmonellen T3SS-vermittelten Tumorvakzinierung gegen VEGFR2 werden die Salmonellen nicht wie in vielen in der Literatur beschriebenen experimentellen Systemen direkt in den Tumor gespritzt, sondern ihrem natürlichen Infektionsweg entsprechend oral bzw. orogastrisch verabreicht. Viele Tumore sind nicht gut zugänglich und können daher auch chirurgisch kaum vollständig entfernt werden. Durch die Vakzinierung mit Salmonellen auf oralem Weg kann einerseits eine spezifische Immunantwort induziert werden und andererseits gelangen die Salmonellen auch über noch nicht näher bekannte Zellen bzw. Wege nach oraler Infektion in das jeweilige Tumorgewebe.

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte Coley, dass bestimmte Krebspatienten mit postoperativen bakteriellen Infektionen von ihren Tumoren geheilt wurden (175). Seit ungefähr 1940 ist bekannt, dass anaerobe Bakterien gezielt in sauerstoffarmen und nekrotischen Bereichen von Tumoren wachsen können (176) und daher wurde seither in verschiedenen Studien auch versucht, Gram-negative, fakultativ anaerobe Salmonellen zur Anti-Tumortherapie einzusetzen. Auch die hier verwendeten Salmonellen SB824 (pHR584) konnten im Melanom-Flankentumor durch Immunfluoreszenz-Färbung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), jedoch konnte kein direkter negativer Effekt der Salmonellenkolonisierung auf das Tumorwachstum gefunden werden, da die mit SB824 immunisierten Mäuse kein verringertes Tumorwachstum im Vergleich zu den nicht immunisierten Kontrollmäusen aufwiesen. Möglicherweise ist die Anzahl von Salmonellen, die nach der orogastrischen Immunisierung den Tumor erreicht und kolonisiert, zu gering, um das Tumorwachstum zu blockieren. Ein mögliche Lösung dieses Problems wäre die direkte Injektion der Salmonellen in den Tumor.

In einer neueren Veröffentlichung zur Frage nach dem Mechanismus der bakteriellen Tumorinvasion zeigten Leschner und Kollegen, dass TNF α die Blutgefäße in Tumoren durchlässig macht. Salmonellen können dadurch in den Tumor einwandern und ihn kolonisieren (177). Einen weiteren eindrucksvollen Beweis für die Tumorinvasion von Bakterien lieferten Yu und Kollegen (178). Sie zeigten im Mausmodell mittels Lumineszenz und Fluoreszenz, dass Salmonellen und andere Bakterien in Tumore und Metastasen einwandern und sich dort replizieren.

107

Liu und Kollegen schlagen als neuen Immunmechanismus zur Unterdrückung des Tumorwachstums vor, dass Salmonellen die Expression von CD44^{high}CD4⁺ regulatorischen T-Zellen herunter regulieren (179). CD25⁺FOXP3⁺CD4⁺T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Immuntoleranz gegen verschiedene Tumorantigene. Suzuki und Kollegen zeigten, dass VEGFR2 auf diesen hoch suppressiven regulatorischen T-Zellen im Menschen exprimiert wird (180). Durch die in dieser Arbeit vorgestellte Samonellen T3SS-vermittelte Vakzinierung gegen VEGFR2 könnte der negative Effekt der Salmonellen auf bestimmte regulatorische T-Zellen also verstärkt werden, weil die generierten KDR2-spezifischen CTLs neben den VEGFR2-positiven Endothelzellen auch die oben genannten regulatorischen T-Zellen angreifen könnten und den Tumor daher besser zugänglich für die Komponenten des Wirtsimmunsystems machen könnten. VEGFR2 hat also neben seiner essentiellen Rolle in der Tumorangiogenese möglicherweise auch eine indirekte Funktion in der Immuntoleranz gegen Tumorantigene und würde dadurch eine weitere Eigenschaft besitzen, die dieses Molekül zu einem therapeutischen Ziel in der Tumorimmuntherapie prädestiniert.

Durch die Salmonellen T3SS-vermittelte Vakzinierung gegen VEGFR2 können Tumore auf mehreren Ebenen attackiert werden. Einige der Vorteile dieser Strategie und mögliche Kombinationen wie beispielsweise die gleichzeitige Nutzung von Salmonellen zur Tumorvakzinierung gegen VEGFR2 oder andere Antigene und als Vehikel zum Transport von Chemotherapeutika in den Tumor sind in Abb. 30 schematisch dargestellt. Salmonellen könnten also in vielfältiger Weise in der Bekämpfung von Krebserkrankungen benutzt werden.

Ein möglicher Nachteil der Anti-VEGFR2 Immuntherapie sind potentielle Nebenwirkungen wie beispielsweise eingeschränkte Wundheilung nach Verletzung oder Beeinträchtigung der Zeugungsfähigkeit. Obwohl viele Gene, die bei der Wundheilung aktiv sind, auch bei der Tumorentstehung und –progression wichtige Regulatoren darstellen, gibt es doch entscheidende Unterschiede zwischen beiden Prozessen (181), wodurch sich die moderaten Nebenwirkungen in Bezug auf den Wundheilungsprozess in Maustumormodellen erklären lassen, in denen die Tumorvaskularisierung als therapeutisches immunologisches Ziel diente. Niethammer und Kollegen zeigten darüber hinaus, dass die DNA-Vakzinierung gegen VEGFR2 keinen Einfluss auf die Zeugungsfähigkeit der immunisierten Mäuse hatte (96).



Abb. 30 Schema über einige Vorteile der Salmonellen T3SS-vermittelten Tumorvakzinierung.

In zukünftigen Experimenten könnte man versuchen, die Immunogenität des VEGFR2-Epitops KDR2 zu steigern, indem ein weiteres immunogenes bakterielles Protein an das Hybridprotein YopE₁₋₁₃₈-KDR2 fusioniert wird. In einem ähnlichen Ansatz wurde dies vor Kurzem von Seavey und Kollegen durch eine Fusion von Flk-1 (VEGFR2) und Listeriolysin (LLO) aus *Listeria monocytogenes* versucht (182).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neuartige Vakzinierungsmethode mit Hilfe von rekombinanten Salmonellen zur Anti-Angiogenese Immuntherapie von Krebserkrankungen vorgestellt. Durch die Salmonellen-induzierte KDR2-spezifische CD8⁺T-Zellantwort wurde die Angiogenese in Melanomen von C57Bl/6 Mäusen inhibiert und dadurch das Wachstum und die Metastasierung von Melanomen reduziert.

6 Literaturverzeichnis

Reference List

- 1. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, et al. Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. Nature 2001 Oct 25;413(6858):852-6.
- 2. Galan JE. Molecular genetic bases of Salmonella entry into host cells. Mol.Microbiol. 1996 Apr;20(2):263-71.
- 3. Medina E, Guzman CA. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. Vaccine 2001 Feb 8;19(13-14):1573-80.
- 4. Tsolis RM, Kingsley RA, Townsend SM, Ficht TA, Adams LG, Baumler AJ. Of mice, calves, and men. Comparison of the mouse typhoid model with other Salmonella infections. Adv.Exp.Med.Biol. 1999;473:261-74.
- 5. Tam MA, Rydstrom A, Sundquist M, Wick MJ. Early cellular responses to Salmonella infection: dendritic cells, monocytes, and more. Immunol.Rev. 2008 Oct;225:140-62.
- 6. Jones BD, Ghori N, Falkow S. Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. J.Exp.Med. 1994 Jul 1;180(1):15-23.
- 7. Santos RL, Baumler AJ. Cell tropism of Salmonella enterica. Int.J.Med.Microbiol. 2004 Oct;294(4):225-33.
- 8. Chieppa M, Rescigno M, Huang AY, Germain RN. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. J.Exp.Med. 2006 Dec 25;203(13):2841-52.
- 9. Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. Salmonellae interplay with host cells. Nat.Rev.Microbiol. 2008 Jan;6(1):53-66.
- Abrahams GL, Hensel M. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular Salmonella enterica and its host cells. Cell Microbiol. 2006 May;8(5):728-37.
- 11. Spreng S, Dietrich G, Weidinger G. Rational design of Salmonella-based vaccination strategies. Methods 2006 Feb;38(2):133-43.
- 12. Galan JE, Ginocchio C. The molecular genetic bases of Salmonella entry into mammalian cells. Biochem.Soc.Trans. 1994 May;22(2):301-6.

- 13. Mittrucker HW, Kohler A, Kaufmann SH. Characterization of the murine Tlymphocyte response to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. Infect.Immun. 2002 Jan;70(1):199-203.
- 14. Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. Science 1999 May 21;284(5418):1322-8.
- 15. Galan JE, Zhou D. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by Salmonella. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2000 Aug 1;97(16):8754-61.
- 16. Hoiseth SK, Stocker BA. Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are nonvirulent and effective as live vaccines. Nature 1981 May 21;291(5812):238-9.
- 17. Roberts M, Bacon A, Li J, Chatfield S. Prior immunity to homologous and heterologous Salmonella serotypes suppresses local and systemic anti-fragment C antibody responses and protection from tetanus toxin in mice immunized with Salmonella strains expressing fragment C. Infect.Immun. 1999 Aug;67(8):3810-5.
- 18. Kubori T, Sukhan A, Aizawa SI, Galan JE. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2000 Aug 29;97(18):10225-30.
- 19. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol.Mol.Biol.Rev. 1998 Jun;62(2):379-433.
- 20. Marlovits TC, Kubori T, Sukhan A, Thomas DR, Galan JE, Unger VM. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. Science 2004 Nov 5;306(5698):1040-2.
- 21. Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galan JE, Aizawa SI. Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. Science 1998 Apr 24;280(5363):602-5.
- 22. Panthel K, Meinel KM, Domenech VE, Retzbach H, Igwe EI, Hardt WD, Russmann H. Salmonella pathogenicity island 2-mediated overexpression of chimeric SspH2 proteins for simultaneous induction of antigen-specific CD4 and CD8 T cells. Infect.Immun. 2005 Jan;73(1):334-41.
- 23. van Ginkel FW, Nguyen HH, McGhee JR. Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. Emerg.Infect.Dis. 2000 Mar;6(2):123-32.
- 24. Vassiloyanakopoulos AP, Okamoto S, Fierer J. The crucial role of polymorphonuclear leukocytes in resistance to Salmonella dublin infections in genetically susceptible and resistant mice. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1998 Jun 23;95(13):7676-81.
- 25. Mittrucker HW, Kaufmann SH. Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice. J.Leukoc.Biol. 2000 Apr;67(4):457-63.
- 26. Kotton CN, Hohmann EL. Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. Infect.Immun. 2004 Oct;72(10):5535-47.

- Loessner H, Endmann A, Leschner S, Bauer H, Zelmer A, zur LS, Westphal K, Weiss S. Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. Int.J.Med.Microbiol. 2008 Jan;298(1-2):21-6.
- 28. Garmory HS, Griffin KF, Brown KA, Titball RW. Oral immunisation with live aroA attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium expressing the Yersinia pestis V antigen protects mice against plague. Vaccine 2003 Jun 20;21(21-22):3051-7.
- 29. Garmory HS, Brown KA, Titball RW. Salmonella vaccines for use in humans: present and future perspectives. FEMS Microbiol.Rev. 2002 Nov;26(4):339-53.
- 30. Hackett J. Salmonella-based vaccines. Vaccine 1990 Feb;8(1):5-11.
- 31. Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, Inaba K, Steinman RM. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. J.Exp.Med. 1989 Mar 1;169(3):1169-78.
- 32. Abbas AK. The control of T cell activation vs. tolerance. Autoimmun.Rev. 2003 May;2(3):115-8.
- Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. Nature 1997 Aug 21;388(6644):782-7.
- 34. Hess J, Schaible U, Raupach B, Kaufmann SH. Exploiting the immune system: toward new vaccines against intracellular bacteria. Adv.Immunol. 2000;75:1-88.
- 35. Kaufmann SH, Hess J. Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development. Immunol.Lett. 1999 Jan;65(1-2):81-4.
- 36. Schaible UE, Collins HL, Kaufmann SH. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. Adv.Immunol. 1999;71:267-377.
- Russmann H. Bacterial type III translocation: a unique mechanism for cytosolic display of heterologous antigens by attenuated Salmonella. Int J Med Microbiol 2003 Apr;293(1):107-12.
- 38. Russmann H, Shams H, Poblete F, Fu Y, Galan JE, Donis RO. Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development. Science 1998 Jul 24;281(5376):565-8.
- 39. Russmann H, Igwe EI, Sauer J, Hardt WD, Bubert A, Geginat G. Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant Salmonella expressing hybrid Yersinia type III proteins. J Immunol. 2001 Jul 1;167(1):357-65.
- 40. van der BP, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De PE, Van den EB, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 1991 Dec 13;254(5038):1643-7.

- 41. Toes RE, Blom RJ, Offringa R, Kast WM, Melief CJ. Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. J.Immunol. 1996 May 15;156(10):3911-8.
- 42. Melief CJ. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. Adv.Cancer Res. 1992;58:143-75.
- 43. Boon T, Cerottini JC, Van den EB, van der BP, Van PA. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. Annu.Rev.Immunol. 1994;12:337-65.
- 44. Minev BR, McFarland BJ, Spiess PJ, Rosenberg SA, Restifo NP. Insertion signal sequence fused to minimal peptides elicits specific CD8+ T-cell responses and prolongs survival of thymoma-bearing mice. Cancer Res. 1994 Aug 1;54(15):4155-61.
- 45. Marzo AL, Lake RA, Robinson BW, Scott B. T-cell receptor transgenic analysis of tumor-specific CD8 and CD4 responses in the eradication of solid tumors. Cancer Res. 1999 Mar 1;59(5):1071-9.
- 46. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1998 Feb 3;95(3):1178-83.
- 47. Panthel K, Meinel KM, Sevil D, V, Geginat G, Linkemann K, Busch DH, Russmann H. Prophylactic anti-tumor immunity against a murine fibrosarcoma triggered by the Salmonella type III secretion system. Microbes.Infect. 2006 Aug;8(9-10):2539-46.
- 48. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J.Clin. 2009 Jul;59(4):225-49.
- 49. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- 50. Greaves M. Darwinian medicine: a case for cancer. Nat.Rev.Cancer 2007 Mar;7(3):213-21.
- 51. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. Carcinogenesis 2009 Jul;30(7):1073-81.
- 52. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. Nature 2008 Jul 24;454(7203):436-44.
- 53. Gilman A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. Am.J.Surg. 1963 May;105:574-8.
- 54. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. Nat.Rev.Clin.Oncol. 2009 Nov;6(11):638-47.
- 55. Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. Nat.Rev.Cancer 2008 Jun;8(6):473-80.

- 56. von MM, Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy for cancer. Annu.Rev.Med. 2003;54:343-69.
- 57. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. Science 2003 May 16;300(5622):1155-9.
- 58. Sun Y, Stevanovic S, Song M, Schwantes A, Kirkpatrick CJ, Schadendorf D, Cichutek K. The kinase insert domain-containing receptor is an angiogenesis-associated antigen recognized by human cytotoxic T lymphocytes. Blood 2006 Feb 15;107(4):1476-83.
- 59. Marincola FM, Wang E, Herlyn M, Seliger B, Ferrone S. Tumors as elusive targets of T-cell-based active immunotherapy. Trends Immunol. 2003 Jun;24(6):335-42.
- 60. Palucka AK, Ueno H, Fay JW, Banchereau J. Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. Immunol.Rev. 2007 Dec;220:129-50.
- 61. King J, Waxman J, Stauss H. Advances in tumour immunotherapy. QJM. 2008 Sep;101(9):675-83.
- 62. Halama N, Zoernig I, Jager D. [Immunotherapy for cancer--modern immunologic strategies in oncology]. Dtsch.Med.Wochenschr. 2008 Oct;133(41):2105-8.
- 63. Reisfeld RA, Niethammer AG, Luo Y, Xiang R. DNA vaccines suppress tumor growth and metastases by the induction of anti-angiogenesis. Immunol.Rev. 2004 Jun;199:181-90.
- 64. Stevenson FK, Ottensmeier CH, Johnson P, Zhu D, Buchan SL, McCann KJ, Roddick JS, King AT, McNicholl F, Savelyeva N, et al. DNA vaccines to attack cancer. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14646-52.
- 65. Stevenson FK, Rice J, Zhu D. Tumor vaccines. Adv.Immunol. 2004;82:49-103.
- 66. Watts C. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. Nat.Immunol. 2004 Jul;5(7):685-92.
- 67. Umar A, Kunkel TA. DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. Eur.J.Biochem. 1996 Jun 1;238(2):297-307.
- 68. Andersen MH, Sorensen RB, Schrama D, Svane IM, Becker JC, Thor SP. Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. Cancer Immunol.Immunother. 2008 Nov;57(11):1735-43.
- 69. Baxevanis CN, Perez SA, Papamichail M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. Cancer Immunol.Immunother. 2009 Mar;58(3):317-24.
- 70. Kieran MW, Turner CD, Rubin JB, Chi SN, Zimmerman MA, Chordas C, Klement G, Laforme A, Gordon A, Thomas A, et al. A feasibility trial of antiangiogenic (metronomic) chemotherapy in pediatric patients with recurrent or progressive cancer. J.Pediatr.Hematol.Oncol. 2005 Nov;27(11):573-81.

- 71. Klement G, Huang P, Mayer B, Green SK, Man S, Bohlen P, Hicklin D, Kerbel RS. Differences in therapeutic indexes of combination metronomic chemotherapy and an anti-VEGFR-2 antibody in multidrug-resistant human breast cancer xenografts. Clin.Cancer Res. 2002 Jan;8(1):221-32.
- 72. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. EXS 1997;79:1-8.
- 73. Folkman J. Antiangiogenic gene therapy. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1998 Aug 4;95(16):9064-6.
- 74. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nat.Med. 2003 Jun;9(6):653-60.
- 75. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature 2005 Dec 15;438(7070):932-6.
- 76. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. J.Cell Sci. 2001 Mar;114(Pt 5):853-65.
- 77. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N.Engl.J.Med. 1971 Nov 18;285(21):1182-6.
- 78. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. N.Engl.J.Med. 2008 May 8;358(19):2039-49.
- 79. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. Nature 2005 Dec 15;438(7070):967-74.
- Dong Y, Qian J, Ibrahim R, Berzofsky JA, Khleif SN. Identification of H-2Db-specific CD8+ T-cell epitopes from mouse VEGFR2 that can inhibit angiogenesis and tumor growth. J.Immunother. 2006 Jan;29(1):32-40.
- 81. Oliner J, Min H, Leal J, Yu D, Rao S, You E, Tang X, Kim H, Meyer S, Han SJ, et al. Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. Cancer Cell 2004 Nov;6(5):507-16.
- 82. Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, Pan L, Hughes V, Valenzuela DM, Murphy AJ, Adams NC, Lin HC, Holash J, et al. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2004 Nov 9;101(45):15949-54.
- 83. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. Nat.Med. 1996 Jun;2(6):689-92.
- 84. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat.Med. 2003 Jun;9(6):669-76.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature 1995 Jul 6;376(6535):62-6.

- El-Obeid A, Sunnuqrut N, Hussain A, Al-Hussein K, Gutierrez MI, Bhatia K. Immature B cell malignancies synthesize VEGF, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR). Leuk.Res. 2004 Feb;28(2):133-7.
- 87. Kumar S, Witzig TE, Timm M, Haug J, Wellik L, Fonseca R, Greipp PR, Rajkumar SV. Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. Leukemia 2003 Oct;17(10):2025-31.
- Gakiopoulou-Givalou H, Nakopoulou L, Panayotopoulou EG, Zervas A, Mavrommatis J, Giannopoulos A. Non-endothelial KDR/flk-1 expression is associated with increased survival of patients with urothelial bladder carcinomas. Histopathology 2003 Sep;43(3):272-9.
- 89. Kranz A, Mattfeldt T, Waltenberger J. Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. Int.J.Cancer 1999 Jun 21;84(3):293-8.
- 90. Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C, Brambilla E. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. J.Pathol. 1999 Aug;188(4):369-77.
- 91. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. Semin.Cancer Biol. 1992 Apr;3(2):65-71.
- 92. Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Deleris G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. Curr.Med.Chem.Anticancer Agents 2003 Mar;3(2):95-117.
- 93. Check HE. So similar, yet so different. Nature 2007 Oct 18;449(7164):762-3.
- 94. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? Nat.Rev.Drug Discov. 2007 Apr;6(4):273-86.
- 95. Xiang R, Luo Y, Niethammer AG, Reisfeld RA. Oral DNA vaccines target the tumor vasculature and microenvironment and suppress tumor growth and metastasis. Immunol.Rev. 2008 Apr;222:117-28.
- 96. Niethammer AG, Xiang R, Becker JC, Wodrich H, Pertl U, Karsten G, Eliceiri BP, Reisfeld RA. A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. Nat.Med 2002 Dec;8(12):1369-75.
- 97. Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? Science 2006 May 26;312(5777):1171-5.
- 98. Fidler IJ. Host and tumour factors in cancer metastasis. Eur.J.Clin.Invest 1990 Oct;20(5):481-6.
- 99. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. Cell 2006 Nov 17;127(4):679-95.

- 100. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. Nat.Rev.Cancer 2006 Jun;6(6):449-58.
- 101. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature 1996 Apr 4;380(6573):439-42.
- 102. Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. Cell 1997 Jun 13;89(6):981-90.
- 103. Pan J, Heiser A, Marget M, Steinmann J, Kabelitz D. Enhanced antimetastatic effect of fetal liver kinase 1 extracellular domain and interferon-gamma fusion gene-modified dendritic cell vaccination. Gene Ther. 2005 May;12(9):742-50.
- 104. St CB, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B, et al. Genes expressed in human tumor endothelium. Science 2000 Aug 18;289(5482):1197-202.
- 105. Dias S, Hattori K, Zhu Z, Heissig B, Choy M, Lane W, Wu Y, Chadburn A, Hyjek E, Gill M, et al. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. J.Clin.Invest 2000 Aug;106(4):511-21.
- 106. Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, et al. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. Cancer Res. 1999 Jan 1;59(1):99-106.
- 107. Zangari M, Anaissie E, Stopeck A, Morimoto A, Tan N, Lancet J, Cooper M, Hannah A, Garcia-Manero G, Faderl S, et al. Phase II study of SU5416, a small molecule vascular endothelial growth factor tyrosine kinase receptor inhibitor, in patients with refractory multiple myeloma. Clin.Cancer Res. 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):88-95.
- Witte L, Hicklin DJ, Zhu Z, Pytowski B, Kotanides H, Rockwell P, Bohlen P. Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an antiangiogenic therapeutic strategy. Cancer Metastasis Rev. 1998 Jun;17(2):155-61.
- 109. Li Y, Wang MN, Li H, King KD, Bassi R, Sun H, Santiago A, Hooper AT, Bohlen P, Hicklin DJ. Active immunization against the vascular endothelial growth factor receptor flk1 inhibits tumor angiogenesis and metastasis. J.Exp.Med. 2002 Jun 17;195(12):1575-84.
- 110. Nair S, Boczkowski D, Moeller B, Dewhirst M, Vieweg J, Gilboa E. Synergy between tumor immunotherapy and antiangiogenic therapy. Blood 2003 Aug 1;102(3):964-71.
- 111. Mochimaru H, Nagai N, Hasegawa G, Kudo-Saito C, Yaguchi T, Usui Y, Kurihara T, Koto T, Satofuka S, Shinoda H, et al. Suppression of choroidal neovascularization by dendritic cell vaccination targeting VEGFR2. Invest Ophthalmol.Vis.Sci. 2007 Oct;48(10):4795-801.

- 112. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. Annu.Rev.Immunol. 2005;23:975-1028.
- 113. Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Zhou H, Reisfeld RA. FLK-1-based minigene vaccines induce T cell-mediated suppression of angiogenesis and tumor protective immunity in syngeneic BALB/c mice. Vaccine 2007 Feb 9;25(8):1409-15.
- 114. Pardoll DM. Cancer vaccines. Nat.Med. 1998 May;4(5 Suppl):525-31.
- 115. Pardoll DM. Therapeutic vaccination for cancer. Clin.Immunol. 2000 Apr;95(1 Pt 2):S44-S62.
- 116. Foster BA, Gingrich JR, Kwon ED, Madias C, Greenberg NM. Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. Cancer Res. 1997 Aug 15;57(16):3325-30.
- Furumoto K, Soares L, Engleman EG, Merad M. Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs. J.Clin.Invest 2004 Mar;113(5):774-83.
- 118. Fidler IJ, Hart IR. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. Science 1982 Sep 10;217(4564):998-1003.
- 119. Poste G, Doll J, Hart IR, Fidler IJ. In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. Cancer Res. 1980 May;40(5):1636-44.
- Berns A. Turning on tumors to study cancer progression. Nat.Med. 1999 Sep;5(9):989-90.
- 121. Berns A. Mouse models for cancer at center stage. AACR special meeting: Cancer Biology and the Mutant Mouse: New Methods, New Models, New Insights, Keystone Colorado, USA, 31 January-5 February 1999. Trends Genet. 1999 May;15(5):177.
- 122. Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW. Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. Nucleic Acids Res. 1989 May 11;17(9):3469-78.
- 123. Busch DH, Pamer EG. T cell affinity maturation by selective expansion during infection. J.Exp.Med. 1999 Feb 15;189(4):701-10.
- 124. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 1986;51 Pt 1:263-73.
- 125. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- 126. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1979 Sep;76(9):4350-4.

- 127. Cantor H, Simpson E, Sato VL, Fathman CG, Herzenberg LA. Characterization of subpopulations of T lymphocytes. I. Separation and functional studies of peripheral Tcells binding different amounts of fluorescent anti-Thy 1.2 (theta) antibody using a fluorescence-activated cell sorter (FACS). Cell Immunol. 1975 Jan;15(1):180-96.
- 128. Hapfelmeier S, Hardt WD. A mouse model for S. typhimurium-induced enterocolitis. Trends Microbiol. 2005 Oct;13(10):497-503.
- 129. Elvin P, Evans CW. Cell adhesiveness and the cell cycle: correlation in synchronized Balb/c 3T3 cells. Biol.Cell 1983;48(1):1-9.
- Russmann H. Yersinia outer protein E, YopE. A versatile type III effector molecule for cytosolic targeting of heterologous antigens by attenuated Salmonella. Adv.Exp.Med Biol. 2003;529:407-13.
- Igwe EI, Geginat G, Russmann H. Concomitant cytosolic delivery of two immunodominant listerial antigens by Salmonella enterica serovar typhimurium confers superior protection against murine listeriosis. Infect.Immun. 2002 Dec;70(12):7114-9.
- 132. Gentschev I, Sokolovic Z, Kohler S, Krohne GF, Hof H, Wagner J, Goebel W. Identification of p60 antibodies in human sera and presentation of this listerial antigen on the surface of attenuated salmonellae by the HlyB-HlyD secretion system. Infect.Immun. 1992 Dec;60(12):5091-8.
- 133. Kuhn M, Goebel W. Identification of an extracellular protein of Listeria monocytogenes possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. Infect.Immun. 1989 Jan;57(1):55-61.
- 134. Russmann H, Weissmuller A, Geginat G, Igwe EI, Roggenkamp A, Bubert A, Goebel W, Hof H, Heesemann J. Yersinia enterocolitica-mediated translocation of defined fusion proteins to the cytosol of mammalian cells results in peptide-specific MHC class I-restricted antigen presentation. Eur.J Immunol. 2000 May;30(5):1375-84.
- 135. Busch DH, Pilip I, Pamer EG. Evolution of a complex T cell receptor repertoire during primary and recall bacterial infection. J.Exp.Med. 1998 Jul 6;188(1):61-70.
- 136. Huster KM, Koffler M, Stemberger C, Schiemann M, Wagner H, Busch DH. Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective Listeriaspecific effector memory T cells. Eur.J.Immunol. 2006 Jun;36(6):1453-64.
- 137. Berchtold C, Panthel K, Jellbauer S, Kohn B, Roider E, Partilla M, Heesemann J, Endres S, Bourquin C, Russmann H. Superior Protective Immunity against Murine Listeriosis by Combined Vaccination with CpG DNA and Recombinant Salmonella. Infect.Immun. 2009 Sep 21.
- 138. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu.Rev.Immunol. 2002;20:709-60.

- 139. Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, Yao VJ, Inai T, Brooks P, Freimark B, et al. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. J.Clin.Invest 2006 Oct;116(10):2610-21.
- Lewis GK. Live-attenuated Salmonella as a prototype vaccine vector for passenger immunogens in humans: are we there yet? Expert.Rev.Vaccines. 2007 Jun;6(3):431-40.
- 141. Gilman RH, Hornick RB, Woodard WE, DuPont HL, Snyder MJ, Levine MM, Libonati JP. Evaluation of a UDP-glucose-4-epimeraseless mutant of Salmonella typhi as a liver oral vaccine. J.Infect.Dis. 1977 Dec;136(6):717-23.
- 142. Diena BB, Ryan A, Wallace R, Johnson EM, Baron LS, Ashton FE. Effectiveness of parenteral and oral typhoid vaccination in mice challenged with a Salmonella typhi-Salmonella typhimurium hybrid. Infect.Immun. 1977 Mar;15(3):997-8.
- 143. Fairweather NF, Chatfield SN, Makoff AJ, Strugnell RA, Bester J, Maskell DJ, Dougan G. Oral vaccination of mice against tetanus by use of a live attenuated Salmonella carrier. Infect.Immun. 1990 May;58(5):1323-6.
- 144. Gonzalez C, Hone D, Noriega FR, Tacket CO, Davis JR, Losonsky G, Nataro JP, Hoffman S, Malik A, Nardin E, et al. Salmonella typhi vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum: strain construction and safety and immunogenicity in humans. J.Infect.Dis. 1994 Apr;169(4):927-31.
- 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 Jan;298(1-2):79-86.
- 146. Spreng S, Gentschev I, Goebel W, Weidinger G, ter M, V, Niewiesk S. Salmonella vaccines secreting measles virus epitopes induce protective immune responses against measles virus encephalitis. Microbes.Infect. 2000 Nov;2(14):1687-92.
- 147. Wei YQ, Wang QR, Zhao X, Yang L, Tian L, Lu Y, Kang B, Lu CJ, Huang MJ, Lou YY, et al. Immunotherapy of tumors with xenogeneic endothelial cells as a vaccine. Nat.Med. 2000 Oct;6(10):1160-6.
- 148. Liu JY, Wei YQ, Yang L, Zhao X, Tian L, Hou JM, Niu T, Liu F, Jiang Y, Hu B, et al. Immunotherapy of tumors with vaccine based on quail homologous vascular endothelial growth factor receptor-2. Blood 2003 Sep 1;102(5):1815-23.
- 149. Plum SM, Holaday JW, Ruiz A, Madsen JW, Fogler WE, Fortier AH. Administration of a liposomal FGF-2 peptide vaccine leads to abrogation of FGF-2-mediated angiogenesis and tumor development. Vaccine 2000 Dec 8;19(9-10):1294-303.
- 150. Okaji Y, Tsuno NH, Saito S, Yoneyama S, Tanaka M, Nagawa H, Takahashi K. Vaccines targeting tumour angiogenesis--a novel strategy for cancer immunotherapy. Eur.J.Surg.Oncol. 2006 May;32(4):363-70.

- 151. Lyons JA, Sheahan BJ, Galbraith SE, Mehra R, Atkins GJ, Fleeton MN. Inhibition of angiogenesis by a Semliki Forest virus vector expressing VEGFR-2 reduces tumour growth and metastasis in mice. Gene Ther. 2007 Mar;14(6):503-13.
- 152. Rosqvist R, Forsberg A, Wolf-Watz H. Intracellular targeting of the Yersinia YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. Infect.Immun. 1991 Dec;59(12):4562-9.
- 153. Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf-Watz H. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of Yersinia YopE cytotoxin into mammalian cells. EMBO J. 1994 Feb 15;13(4):964-72.
- 154. Grassl GA, Finlay BB. Pathogenesis of enteric Salmonella infections. Curr.Opin.Gastroenterol. 2008 Jan;24(1):22-6.
- 155. Seibert SA, Mex P, Kohler A, Kaufmann SH, Mittrucker HW. TLR2-, TLR4- and Myd88-independent acquired humoral and cellular immunity against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Immunol.Lett. 2009 Nov 4.
- 156. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. Cell 1994 Jan 28;76(2):287-99.
- 157. Butz E, Bevan MJ. Dynamics of the CD8+ T cell response during acute LCMV infection. Adv.Exp.Med.Biol. 1998;452:111-22.
- 158. Doherty PC. The numbers game for virus-specific CD8+ T cells. Science 1998 Apr 10;280(5361):227.
- 159. Doherty PC. The pas de deux of viruses and CD8 T cells. Immunol.Rev. 2002 Jul;185:39-49.
- 160. Bevan MJ, Fink PJ. The CD8 response on autopilot. Nat.Immunol. 2001 May;2(5):381-2.
- 161. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrancois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. Science 2001 Mar 23;291(5512):2413-7.
- Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature 1999 Oct 14;401(6754):708-12.
- 163. Huster KM, Stemberger C, Busch DH. Protective immunity towards intracellular pathogens. Curr.Opin.Immunol. 2006 Aug;18(4):458-64.
- 164. Zinkernagel RM, Hengartner H. On immunity against infections and vaccines: credo 2004. Scand.J.Immunol. 2004 Jul;60(1-2):9-13.
- 165. Ochsenbein AF, Karrer U, Klenerman P, Althage A, Ciurea A, Shen H, Miller JF, Whitton JL, Hengartner H, Zinkernagel RM. A comparison of T cell memory against the same antigen induced by virus versus intracellular bacteria. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1999 Aug 3;96(16):9293-8.

- 166. Stemberger C, Neuenhahn M, Buchholz VR, Busch DH. Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets. Cell Mol.Immunol. 2007 Dec;4(6):399-405.
- 167. Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? Curr.Opin.Immunol. 1998 Oct;10(5):581-7.
- 168. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J.Exp.Med. 1971 Feb 1;133(2):275-88.
- 169. Lee SL, Rouhi P, Dahl JL, Zhang D, Ji H, Hauptmann G, Ingham P, Cao Y. Hypoxiainduced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion, and metastasis in a zebrafish tumor model. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2009 Nov 17;106(46):19485-90.
- 170. Taylor M, Rossler J, Geoerger B, Laplanche A, Hartmann O, Vassal G, Farace F. High levels of circulating VEGFR2+ Bone marrow-derived progenitor cells correlate with metastatic disease in patients with pediatric solid malignancies. Clin.Cancer Res. 2009 Jul 15;15(14):4561-71.
- 171. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell 1997 Jan 24;88(2):277-85.
- 172. Cunningham C, Nemunaitis J. A phase I trial of genetically modified Salmonella typhimurium expressing cytosine deaminase (TAPET-CD, VNP20029) administered by intratumoral injection in combination with 5-fluorocytosine for patients with advanced or metastatic cancer. Protocol no: CL-017. Version: April 9, 2001. Hum.Gene Ther. 2001 Aug 10;12(12):1594-6.
- 173. Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N, Kuhn J, Cramm J, Litz C, Cavagnolo R, Cahill A, Clairmont C, Sznol M. Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. Cancer Gene Ther. 2003 Oct;10(10):737-44.
- 174. Low KB, Ittensohn M, Luo X, Zheng LM, King I, Pawelek JM, Bermudes D. Construction of VNP20009: a novel, genetically stable antibiotic-sensitive strain of tumor-targeting Salmonella for parenteral administration in humans. Methods Mol.Med. 2004;90:47-60.
- 175. Agrawal N, Bettegowda C, Cheong I, Geschwind JF, Drake CG, Hipkiss EL, Tatsumi M, Dang LH, Diaz LA, Jr., Pomper M, et al. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2004 Oct 19;101(42):15172-7.
- 176. Zhao M, Geller J, Ma H, Yang M, Penman S, Hoffman RM. Monotherapy with a tumor-targeting mutant of Salmonella typhimurium cures orthotopic metastatic mouse models of human prostate cancer. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2007 Jun 12;104(24):10170-4.

- 177. Leschner S, Westphal K, Dietrich N, Viegas N, Jablonska J, Lyszkiewicz M, Lienenklaus S, Falk W, Gekara N, Loessner H, et al. Tumor invasion of Salmonella enterica serovar Typhimurium is accompanied by strong hemorrhage promoted by TNF-alpha. PLoS.One. 2009;4(8):e6692.
- 178. Yu YA, Shabahang S, Timiryasova TM, Zhang Q, Beltz R, Gentschev I, Goebel W, Szalay AA. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. Nat.Biotechnol. 2004 Mar;22(3):313-20.
- 179. Liu T, Chopra AK. An enteric pathogen Salmonella enterica serovar Typhimurium suppresses tumor growth by downregulating CD44(high) and CD4T regulatory (T(reg)) cell expression in mice: the critical role of lipopolysaccharide and Braun lipoprotein in modulating tumor growth. Cancer Gene Ther. 2009 Aug 28.
- 180. Suzuki H, Onishi H, Wada J, Yamasaki A, Tanaka H, Nakano K, Morisaki T, Katano M. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) is selectively expressed by FOXP3(high)CD4(+) regulatory T cells. Eur.J.Immunol. 2009 Nov 9.
- 181. Schafer M, Werner S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 2008 Aug;9(8):628-38.
- 182. Seavey MM, Maciag PC, Al-Rawi N, Sewell D, Paterson Y. An anti-vascular endothelial growth factor receptor 2/fetal liver kinase-1 Listeria monocytogenes antiangiogenesis cancer vaccine for the treatment of primary and metastatic Her-2/neu+ breast tumors in a mouse model. J.Immunol. 2009 May 1;182(9):5537-46.

7 Anhang

7.1 DNA-Sequenzen

7.1.1 kdr2

CGAATCCCTGTGAAGTATCTCAGTTACCCAGCTCCTGATATCAAATGGTACAGAAATGGAAGGCCCATTG AGTCCAACTACACAATGATTGTTGGCGATGAACTCACCATCATGGAAGTGACTGAAAGAGATGCAGGAAA CTACACGGTATCCTCACCAACCCCATTTCAATGGAGAAACAG

7.1.2 Ausschnitt aus pHR584: YopE₁₃₈-kdr2

7.1.3 Murines flk1 (VEGFR2)

CTGTGTTTCCTTAGATCGCGCGGACCGCTACCCGGCAGGACTGAAAGCCCAGACTGTGTCCCGCAGCCGG CGCTCTCCCCGGTCTTGCGCTGCGGGGGGGGCGCATACCGCCTCTGTGACTTCTTTGCGGGCCAGGGACGGAG AAGGAGTCTGTGCCTGAGAACTGGGCTCTGTGCCCAGCGCGAGGTGCAGGATGGAGAGCAAGGCGCTGCT AGCTGTCGCTCTGTGGTTCTGCGTGGAGACCCGAGCCGCCTCTGTGGGTTTGCCTGGCGATTTTCTCCAT CCCCCCAAGCTCAGCACAGAAAGACATACTGACAATTTTGGCAAATACAACCCTTCAGATTACTTGCA GGGGACAGCGGGACCTGGACTGGCTTTGGCCCAATGCTCAGCGTGATTCTGAGGAAAGGGTATTGGTGAC TGAATGCGGCGGTGGTGACAGTATCTTCTGCAAAACACTCACCATTCCCAGGGTGGTTGGAAATGATACT GGAGCCTACAAGTGCTCGTACCGGGACGTCGACATAGCCTCCACTGTTTATGTCTATGTTCGAGATTACA GATCACCATTCATCGCCTCTGTCAGTGACCAGCATGGCATCGTGTACATCACCGAGAACAAGAACAAAAC TGTGGTGATCCCCTGCCGAGGGTCGATTTCAAACCTCAATGTGTCTCTTTGCGCTAGGTATCCAGAAAAG AGATTTGTTCCGGATGGAAACAGAATTTCCTGGGACAGCGAGATAGGCTTTACTCTCCCCAGTTACATGA TCAGCTATGCCGGCATGGTCTTCTGTGAGGCAAAGATCAATGATGAAACCTATCAGTCTATCATGTACAT AGTTGTGGTTGTAGGATATAGGATTTATGATGTGATTCTGAGCCCCCCGCATGAAATTGAGCTATCTGCC GGAGAAAAACTTGTCTTAAATTGTACAGCGAGAACAGAGCTCAATGTGGGGCCTTGATTTCACCTGGCACT CTCCACCTTCAAAGTCTCATCATAAGAAGATTGTAAACCGGGATGTGAAACCCTTTCCTGGGACTGTGGC GAAGATGTTTTTGAGCACCTTGACAATAGAAAGTGTGACCAAGAGTGACCAAGGGGAATACACCTGTGTA GCGTCCAGTGGACGGATGATCAAGAGAAATAGAACATTTGTCCGAGTTCACACAAAGCCTTTTATTGCTT TCGGTAGTGGGATGAAATCTTTGGTGGAAGCCACAGTGGGCAGTCAAGTCCGAATCCCTGTGAAGTATCT CAGTTACCCAGCTCCTGATATCAAATGGTACAGAAATGGAAGGCCCATTGAGTCCAACTACACAATGATT GTTGGCGATGAACTCACCATCATGGAAGTGACTGAAAGAGATGCAGGAAACTACACGGTCATCCTCACCA ACCCCATTTCAATGGAGAAACAGAGCCACATGGTCTCTCTGGTTGTGAATGTCCCACCCCAGATCGGTGA GAAAGCCTTGATCTCGCCTATGGATTCCTACCAGTATGGGACCATGCAGACATTGACATGCACAGTCTAC GCCAACCCTCCCCTGCACCACATCCAGTGGTACTGGCAGCTAGAAGAAGCCTGCTCCTACAGACCCGGCC AAACAAGCCCGTATGCTTGTAAAGAATGGAGACACGTGGAGGATTTCCAGGGGGGAAACAAGATCGAAGT CACCAAAAACCAATATGCCCTGATTGAAGGAAAAAACAAAACTGTAAGTACGCTGGTCATCCAAGCTGCC AACGTGTCAGCGTTGTACAAATGTGAAGCCATCAACAAAGCGGGACGAGGAGAGAGGGTCATCTCCTTCC ATGTGATCAGGGGTCCTGAAATTACTGTGCAACCTGCTGCCCAGCCAACTGAGCAGGAGAGTGTGTCCCT GTTGTGCACTGCAGACAGAAATACGTTTGAGAACCTCACGTGGTACAAGCTTGGCTCACAGGCAACATCG GTCCACATGGGCGAATCACTCACACCAGTTTGCAAGAACTTGGATGCTCTTTGGAAACTGAATGGCACCA TGTTTTCTAACAGCACAAATGACATCTTGATTGTGGCATTTCAGAATGCCTCTCTGCAGGACCAAGGCGA

Anhang

CTATGTTTGCTCTGCTCAAGATAAGAAGACCAAGAAAAGACATTGCCTGGTCAAACAGCTCATCATCCTA GAGCGCATGGCACCCATGATCACCGGAAATCTGGAGAATCAGACAACAACCATTGGCGAGACCATTGAAG TGACTTGCCCAGCATCTGGAAATCCTACCCCACACATTACATGGTTCAAAGACAACGAGACCCTGGTAGA GGCCTCTACACCTGCCAGGCCTGCAATGTCCTTGGCTGTGCAAGAGCGGAGACGCTCTTCATAATAGAAG GTGCCCAGGAAAAGACCAACTTGGAAGTCATTATCCTCGTCGGCACTGCAGTGATTGCCATGTTCTTCTG GCTCCTTCTTGTCATTGTCCTACGGACCGTTAAGCGGGCCAATGAAGGGGAACTGAAGACAGGCTACTTG TCTATTGTCATGGATCCAGATGAATTGCCCTTGGATGAGCGCTGTGAACGCTTGCCTTATGATGCCAGCA AGTGGGAATTCCCCAGGGACCGGCTGAAACTAGGAAAACCTCTTGGCCGCGGTGCCTTCGGCCAAGTGAT TGAGGCAGACGCTTTTGGAATTGACAAGACAGCGACTTGCAAAACAGTAGCCGTCAAGATGTTGAAAGAA GGAGCAACACACGAGCGAGCATCGAGCCCTCATGTCTGAACTCAAGATCCTCATCCACATTGGTCACCATC TCAATGTGGTGAACCTCCTAGGCGCCTGCACCAAGCCGGGAGGGCCTCTCATGGTGATTGTGGAATTCTG CAAGTTTGGAAACCTATCAACTTACTTACGGGGCAAGAGAAATGAATTTGTTCCCTATAAGAGCAAAGGG GCACGCTTCCGCCAGGGCAAGGACTACGTTGGGGAGCTCTCCGTGGATCTGAAAAGACGCTTGGACAGCA TCACCAGCAGCCAGAGCTCTGCCAGCTCAGGCTTTGTTGAGGAGAAATCGCTCAGTGATGTAGAGGAAGA AGAAGCTTCTGAAGAACTGTACAAGGACTTCCTGACCTTGGAGCATCTCATCTGTTACAGCTTCCAAGTG GCTAAGGGCATGGAGTTCTTGGCATCAAGGAAGTGTATCCACAGGGACCTGGCAGCACGAAACATTCTCC TATCGGAGAAGAATGTGGTTAAGATCTGTGACTTCGGCTTGGCCCGGGACATTTATAAAGACCCCGGATTA TGTCAGAAAAGGAGATGCCCGACTCCCTTTGAAGTGGATGGCCCCGGAAACCATTTTTGACAGAGTATAC ACAATTCAGAGCGATGTGGTGTTTCCGGTGTGTTGCTCTGGGAAATATTTTCCTTAGGTGCCTCCCCAT ACCCTGGGGTCAAGATTGATGAAGAATTTTGTAGGAGATTGAAAGAAGGAACTAGAATGCGGGCTCCTGA CTACACTACCCCAGAAATGTACCAGACCATGCTGGACTGCTGGCATGAGGACCCCCAACCAGAGACCCTCG TTGTTCTTCCAATGTCAGAGACACTGAGCATGGAAGAGGATTCTGGACTCTCCCTGCCTACCTCACCTGT TTCCTGTATGGAGGAAGAGGAAGTGTGCGACCCCAAATTCCATTATGACAACACAGCAGGAATCAGTCAT GAAAACTCTGGAAGACAGGAACAAATTATCTCCATCTTTTGGTGGAATGATGCCCAGTAAAAGCAGGGAG TCTGTGGCCTCGGAAGGCTCCAACCAGACCAGTGGCTACCAGTCTGGGTATCACTCAGATGACACAGACA CCACCGTGTACTCCAGCGACGAGGCAGGACTTTTAAAGATGGTGGATGCTGCAGTTCACGCTGACTCAGG GACCACACTGCGCTCACCTCCTGTTTAAATGGAAGTGGTCCTGTCCCGGCTCCGCCCCAACTCCTGGAA ATCACGAGAGAGGTGCTGCTTAGATTTTCAAGTGTTGTTCTTTCCACCACCCGGAAGTAGCCACATTTGA TTTTCATTTTTGGAGGAGGGACCTCAGACTGCAAGGAGCTTGTCCTCAGGGCATTTCCAGAGAAGATGCC CATGACCCAAGAATGTGTTGACTCTACTCTCTTTTCCATTCAATAAAGTCCTATATAATGTGCCCTGC TGTGGTCTCACTACCAGTTAAAGCAAAAGACTTTCAAACAGTGGCTCTGTCCTCCAAGAAGTGGCAACGG CACCTCTGTGAAACTGGATCGAATGGGCAATGCTTTGTGTGTTGAGGATGGGTGAGATGTCCCAGGGCCG AGTCTGTCTACCTTGGAGGCTTTGTGGAGGATGCGGGCTATGAGCCAAGTGTTAAGTGTGGGATGTGGAC TGGGAGGAAGGAAGGCGCAAGCTCGCTCGGAGAGCGGTTGGAGCCTGCAGATGCATTGTGCTGGCTCTGG CTGTGCCTTAATTCAGAACACCAAAAGAGAGGAACGTCGGCAGAGGCTCCTGACGGGGCCGAAGAATTGT GAGAACAGAACAGAAACTCAGGGTTTCTGCTGGGTGGAGACCCACGTGGCTGCCCTGGTGGCAGTGTCTG AGGGTTCTCTGTCAAGTGGCGGTAAAGGCTCAGGCTGGTGTTCTTCCTCTATCTCCACTCCTGTCAGGCC CCAGATAATCACTAGCCAGATTTCGAAATTACTTTTTAGCCGAGGTTATGATAACATCTACTGTATCCTT AAAA

8 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Holger Rüssmann für das interessante Thema und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, herzlich bedanken. Außerdem danke ich ihm für die gute Betreuung und für seine stete Aufmerksamkeit und Hilfe bei Problemen aller Art.

Ein weiterer herzlicher Dank gilt Frau Prof. Angelika Böttger für die hervorragende Betreuung der Arbeit seitens der Fakultät für Biologie.

Außerdem gilt mein Dank Prof. Jürgen Heesemann für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie der LMU in München.

Ein weiterer großer Dank gilt den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der AG Rüssmann sowie den benachbarten Arbeitsgruppen des dritten und vierten Stockwerks im Pettenkofer-Institut. Vor Allem will ich Gudrun Pfaffinger für ihre exzellente Hilfe bei zahlreichen Experimenten und die Unterstützung nicht nur beim morgendlichen Butterbrezen-Frühstück danken. Auch Klaus Panthel, Konrad Trülzsch, Kathrin Meinel, Victoria Sevil, Brigitte Köhn, Justin Hetrodt, Miriam Partilla, Christina Berchtold, Elisabeth Roider und Christian Lottspeich waren mir stets eine gute Hilfe und angenehme Mitarbeiter im Laboralltag und darüber hinaus.

Ich möchte mich auch bei Andrea Kotz, Julia Niefnecker, Beate Czech, Virginie Nägele, Claudia Ertl, Iris Barwig, Xaver Sewald und Steffi Rohrer für die Hilfe bei der Korrektur und bei vielen anderen Problemen im Laboralltag ganz herzlich bedanken.

Außerdem gilt mein Dank Andreas Wieser, weil er mir freundlicherweise das Plasmid pST1 zur Verfügung stellte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Bei Andreas Niethammer will ich mich für die Bereitstellung des Flk-1-Plasmids bedanken. Ein weiterer Dank gilt der AG von Dirk H. Busch von der TU München für die Herstellung der KDR-Tetramere.

Ganz besonders herzlich bedanken will ich mich bei meiner Familie. Meine Eltern und meine Brüder unterstützen mich in jeder Lebenslage, haben immer ein offenes Ohr für mich und helfen mir, wo immer sie können.

Ein weiterer ganz herzlicher Dank gebührt meiner Nisha, weil sie stets für mich da ist und mir mit ihrer Liebe unendlich viel Kraft gibt.
Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Stefan Jellbauer
Geburtsdaten:	02.12.1979 in Altötting
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Akademische Ausbildung

Oktober 2006-März 2010	Dissertation
	Ludwig-Maximilians-Universität München,
	Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische
	Mikrobiologie
	Titel: "Tumorvakzinierung gegen "Vascular Endothelial
	Growth Factor Receptor 2" (VEGFR2) mittels
	heterologem Antigentransport durch rekombinante
	Salmonellen"
Sentember 2005-Mai 2006	Dinlomatheit
September 2003-War 2000	Max Planck Institut für Pischemie Abt Molekulare
	Zallhialagia Draf Dr. Stafan Jantaah
	Litel: "Regulation von BRUCE in post-Golgi
	Transportprozessen", Note 1,0
2006	Abschluss: Diplom Biologe univ., Note 1,2
	Hauptfach: Zellbiologie
	Nebenfächer: Genetik, Biochemie und
	Mikrobiologie
September 2004- März 200	5 Auslandssemester in Granada, Spanien als "Free Mover"
2002	Vordiplom
Oktober 2000 Juni 2006	Ludwig-Maximilians-Universität München
OKtobel 2000 – Julii 2000	
OKIOOCI 2000 –Julii 2000	Studiengang Diplom-Biologie
Schulausbildung	Studiengang Diplom-Biologie
Schulausbildung 1999	Studiengang Diplom-Biologie Abitur