

Vergleichende Untersuchung verschiedener genetischer Impfstoffvektoren *in vivo*

**Analyse der adaptiven Immunantwort nach
Immunisierung mit DNA-, HSV-1- und MVA-Vakzinen**

Henning Lauterbach



München 2004

**Vergleichende Untersuchung verschiedener
genetischer Impfstoffvektoren *in vivo***

**Analyse der adaptiven Immunantwort nach
Immunsierung mit DNA-, HSV-1- und MVA-Vakzinen**

Dissertation
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Henning Lauterbach
aus Kassel

München, 25. März 2004

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit flossen in folgende Publikation ein:

Lauterbach H., Kerksiek K.M., Busch D.H., Berto E., Bozac A., Mavromara P., Manservigi R., Epstein A.L., Marconi P. und Brocker T. (2004) Protection from bacterial infection by a single vaccination with replication-deficient Herpes Simplex Virus-1; **J Virol** **78** (8)

Erstgutachter:

Prof. Dr. E. Weiß

Zweitgutachter:

Prof. Dr. D. Eick

Betreuer der Arbeit:

Prof. Dr. T. Brocker

(Sondergutachter)

Tag der mündlichen Prüfung:

28. Juli 2004

INHALTSVERZEICHNIS

1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	12
2 ZUSAMMENFASSUNG	15
3 EINLEITUNG	16
3.1 Vakzine	16
3.2 Mechanismen des Immunschutzes	17
3.2.1 Initiierung einer Immunantwort	18
3.2.2 T-Lymphozyten	20
3.2.2.1 T-Zellaktivierung	21
3.2.2.2 CD4-T-Zellen	22
3.2.2.3 CD8-T-Zellen	22
3.2.3 B-Zellen und Antikörper	23
3.2.4 Das immunologische Gedächtnis	24
3.3 Impfstofftechnologien	25
3.3.1 DNA-Vakzine	26
3.3.2 Virale Vektoren	30
3.3.2.1 HSV-1-Vektoren	33
3.3.2.2 HSV-1 Amplikons	35
3.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	37
3.5 Zielsetzung	39
4 MATERIAL UND METHODEN	42
4.1 Material	42
4.1.1 Chemikalien	42
4.1.2 Geräte	42
4.1.3 Verbrauchsmaterialien	42
4.1.4 Peptide, Proteine und Oligonukleotide	43
4.1.5 Antikörper	43
4.1.6 Plasmide	44
4.1.7 Virale Vektoren	45
4.1.8 Mausstämme	46
4.1.9 Pufferlösungen und Medien	47
4.2 Methoden	50
4.2.1 Molekularbiologische Methoden	50
4.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese	50
4.2.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	50
4.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA	50
4.2.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration	51
4.2.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	51
4.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	51
4.2.1.7 Bakterienkultur	52
4.2.1.8 Herstellung chemokompetenter Bakterien	52

4.2.1.9 Transformation chemokompetenter Bakterien	52
4.2.1.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)	53
4.2.1.11 Isolierung genomischer DNA aus Gewebebiopsien	54
4.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden	55
4.2.2.1 Lymphozytenanreicherung und Serumgewinnung aus peripheren Blut	55
4.2.2.2 Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension	55
4.2.2.3 Erythrozytenlyse	56
4.2.2.4 Färbung von Lymphozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern	57
4.2.2.5 Durchflußzytometrie (FACS Analyse)	57
4.2.2.6 Bestimmung der Zellzahl	58
4.2.2.7 Adoptiver Zelltransfer	58
4.2.2.8 <i>Gene Gun</i> -Immunsisierung	59
4.2.2.9 Immunsisierung mit Peptid in kompletten Freund'schen Adjuvans	59
4.2.2.10 Immunsisierung mit rekombinanten Herpes Simplex Viren Typ 1 (rHSV-1)	60
4.2.2.11 <i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest	60
4.2.2.12 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA)	61
4.3 Statistik	62
5 ERGEBNISSE	64
5.1 Die Immunantwort auf DNA-Immunsierungen	64
5.1.1 Einfluß der zellulären Lokalisierung des Antigens auf die Antikörperantwort	65
5.1.2 Einfluß der zellulären Lokalisierung des Antigens auf die CD4-T-Zellantwort	66
5.1.3 Einfluß der zellulären Lokalisierung des Antigens auf die CD8-T-Zellantwort	70
5.2 Die Immunantwort nach Immunsisierung mit HSV-1-basierten Vakzinen	73
5.2.1 Vergleich der Antikörperantwort nach DNA- und rHSV-1-Immunsisierung	73
5.2.2 Vergleich der CD4-T-Zellantwort nach Immunsisierung mit DNA oder rHSV-1	75
5.2.3 Vergleich der monoklonalen CD8-T-Zellantwort nach DNA- und rHSV-1-Immunsisierung	77
5.2.4 Induktion von CTL-Effektorfunktionen durch Immunsisierung mit DNA oder rHSV-1	79
5.2.5 Vergleich der polyklonalen CD8-T-Zellantwort nach Immunsisierung mit DNA oder viralen Vektoren	80
5.2.6 Vergleich von CTL-Effektorfunktionen nach Immunsisierung mit HSV-1-Vektoren	88
5.2.7 Einfluß der Injektionsroute von rHSV-1 auf die CD8-T-Zellantwort	90
5.3 Impfschutz gegen intrazelluläre Bakterien	94
5.3.1 Schutz gegen <i>Listeria monocytogenes</i> -Infektion durch Impfung mit DNA oder rHSV-1	94
5.3.2 Vakzinierung mit rHSV-1 schützt vor Infektion mit hohen LM-OVA-Dosen	96
5.3.3 Langzeitschutz durch DNA- und rHSV-1-Vakzinierung gegen Listerieninfektion	98
5.4 Der Einfluß einer bestehenden antiviralen Immunantwort auf rHSV-1-Vakzinierung	103
5.4.1 HSV-1-Immunität vermindert die antigenspezifische CD8-T-Zellantwort	103
5.4.2 Bestehende antivirale Immunantwort vermindert CTL-Effektorfunktionen	105
6 DISKUSSION	108
6.1 Die Rolle der zellulären Lokalisierung des Antigens nach DNA-Immunsisierung	108
6.2 Die Immunantwort auf Immunsisierung mit rHSV-1	114

6.3	Protektion gegen Infektion mit intrazellulären Bakterien	120
6.4.	Einfluß bestehender antiviraler Immunantwort auf die Vakzinierungseffizienz von rHSV-1	123
7	AUSBLICK	126
8	LITERATURVERZEICHNIS	128
9	LEBENS LAUF	155
10	DANKSAGUNG	157



1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Einheiten wurden mit dem international gebräuchlichen SI-System abgekürzt. Für Aminosäuren und Nukleotide wurde der Einbuchstabenkode verwendet. Für die Abkürzung gebräuchlicher Wörter wurde gemäß Duden verfahren.

Abb.	Abbildung
AMP	HSV-Amplikon
_{hf} AMP	helfervirusfreies Amplikon
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>) oder Allophycocyanin
BCR	B-Zellrezeptor (<i>B cell receptor</i>)
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CMV	Zytomegalievirus (<i>cytomegalovirus</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
ds	doppelsträngig
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FBS	Fötale Kälberserum (<i>foetal bovine serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HSV	Herpes Simplex Virus
ICP	<i>infectious cell protein</i>
IE	<i>immediate early</i>
I.E.	infektiöse Einheiten
IL	Interleukin
i.d., i.n., i.p., i.v.	intradermal, intranasal, intraperitoneal, intravenös
INF	Interferon

LD ₅₀	Halbletale Dosis
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
LM-OVA	ovalbuminexprimierende <i>Listeria monocytogenes</i>
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MVA	Modifiziertes Vakzinia Virus Ankara (<i>modified vaccinia virus ancara</i>)
OD	Optische Dichte
OVA	Hühner-Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline solution</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
rHSV-1	rekombinante HSV-1
RIP	Ratteninsulinpromotor (<i>rat insulin promoter</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SARS	Schweres akutes Atemsyndrom (<i>severe acute respiratory syndrome</i>)
s.k.	subkutan
Tab.	Tabelle
T _{EM}	Effektor Gedächtnis T-Zellen (<i>effector memory T cells</i>)
T _{CM}	Zentrale Gedächtnis T-Zellen (<i>central memory T cells</i>)
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
T _H	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
top.	topisch (auf die Haut)
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
vhs	<i>virion host shutoff</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organisation</i>)
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse



2 ZUSAMMENFASSUNG

Impfstoffe gelten als effektive und günstige Arzneimittel. Jedoch stehen für viele Infektionskrankheiten wie AIDS, Tuberkulose, Hepatitis C oder Malaria keine oder keine wirksamen Impfmöglichkeiten zur Verfügung.

Um gegen intrazelluläre Erreger oder auch Tumore wirksam zu sein, muß ein potentieller Impfstoff eine humorale und eine starke zelluläre Immunantwort induzieren. Diese Voraussetzung kann vor allem durch genetische Immunisierungen mit DNA oder viralen Vektoren erfüllt werden. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit das Potential einer DNA-Vakzine und eines HSV-1-basierten Vektors untersucht, Mäuse vor Infektionen mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* zu schützen.

Zunächst wurde die Immunantwort untersucht, welche durch Immunisierung mit einem OVA-kodierenden Plasmid induziert wurde. Dabei konnte erstmals *in vivo* gezeigt werden, daß die Form (sezerniert oder membrangebunden) des exprimierten Antigens nach einer DNA-Immunsierung mittels *Gene Gun* sowohl das Ausmaß der humoralen Immunantwort beeinflusst, als auch die Expansion antigenspezifischer CD4- und CD8-T-Zellen.

Desweiteren stellte sich heraus, daß replikationsinkompetente, rekombinante HSV-1-(rHSV-1) Vektoren und HSV-1-Amplikons in der Lage sind, eine sehr starke CTL-Antwort, aber nur eine schwache Antikörper- und CD4-T-Zellantwort zu induzieren. Eine starke, antigenspezifische CTL-Antwort konnte ebenso durch Immunisierung mit rekombinanten MVA-Vektoren generiert werden.

In Vakzinierungsexperimenten konnte nachgewiesen werden, daß mit rHSV-1 immunisierte Mäuse vor Infektionen mit hohen Dosen an rekombinanten Listerien geschützt waren, wohingegen DNA-immunisierte Mäuse nur vor Infektionen mit einer mittleren, aber dennoch letalen Dosis geschützt waren. Der Immunschutz war in beiden Fällen von langer Dauer.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, daß die DNA-Immunsierung per *Gene Gun* eine einfach anzuwendende, verlässliche und effektive Methode ist, eine humorale und zelluläre protektive Immunantwort in Mäusen zu induzieren. Besonders im Hinblick auf neue Vakzinierungsstrategien gegen intrazelluläre Erreger, die vor allem durch starke zytotoxische T-Zellantworten bekämpft werden können, erscheinen Immunisierungen mit rHSV-1-Vektoren als sehr geeignete Methode, die es gilt, sorgfältig zu untersuchen und weiterzuentwickeln.

3 EINLEITUNG

3.1 Vakzine

Die Entwicklung von Impfstoffen stellt einen der größten Erfolge der biomedizinischen Forschung dar. Nachdem E. Jenner 1796 damit begann, systematisch Pockenimpfungen durchzuführen, konnte knapp 200 Jahre später der Erreger der Pocken, das Variolavirus, von der Weltgesundheitsorganisation (*world health organisation*, WHO) als ausgerottet erklärt werden (WHO: <http://www.who.int>). Auch gegen eine Reihe anderer Infektionskrankheiten wird heute routinemäßig mit Erfolg geimpft. Durch diese Maßnahmen ist es gelungen, das Auftreten dieser Krankheiten in einigen Ländern um bis zu 100% zu vermindern. Darunter fallen Diphtherie, Masern, Mumps, Keuchhusten, Polio, Röteln und Tetanus. Trotz dieser beeindruckenden Erfolge sind Infektionskrankheiten heute immer noch für die meisten Todesfälle weltweit verantwortlich. Der Grund dafür sind zum Teil technische, Impfstoffe gegen Masern sind beispielsweise hitzeempfindlich, oder ökonomische Probleme in Entwicklungsländern, die ausgedehnte Impfprogramme verhindern. Die Hauptursache liegt allerdings in dem Fehlen von Vakzinen gegen eine Vielzahl an pathogenen Organismen und Viren. So gibt es beispielsweise keine wirksamen Vakzine gegen Tuberkulose, Lepra, Denguefieber, Malaria, Listeriosis, AIDS und SARS. Bei den Erregern dieser Krankheiten handelt es sich meist um Viren, intrazelluläre Bakterien oder intrazelluläre Parasiten, die in der Regel gering zytopathisch sind, nur langsam replizieren und dahin tendieren, im Wirt zu persistieren. Erreger, gegen die bereits Impfstoffe vorhanden sind, induzieren dagegen eher akute, sich selbst-limitierende Infektionen, die schnell zum Tod des Wirts führen können.

Insofern gibt es dringenden Bedarf an verbesserten und neuen Impfstoffen. Dabei muß bedacht werden, daß es trotz der generellen Anforderungen, die eine ideale Vakzine erfüllen sollte (Tabelle 3.1), keine allgemeingültige Strategie bei der Entwicklung von Impfstoffen gibt. Die Erfordernisse einer erfolgreichen Impfung hängen von den Eigenschaften des jeweiligen Pathogens ab.

Tabelle 3.1: Eigenschaften einer idealen Vakzine

Eine ideale Vakzine sollte:

- lebenslange Immunität gewähren
 - vor allen Varianten eines Organismus schützen
 - die Übertragung des Organismus verhindern
 - schnell eine effektive Immunantwort induzieren
 - in allen Empfängern effektiv sein (Kinder, Ältere, Immunsupprimierte)
 - nur eine Immunisierung benötigen
 - ohne Injektion anwendbar sein
 - billig, sicher und biologisch stabil (ohne Kühlkette) sein.
-

Quelle: (Beverley, P.C., 2002), verändert.

3.2 Mechanismen des Immunschutz

Trotz der großen Häufigkeit pathogener und nicht-pathogener Mikroorganismen kommt es relativ selten zu Infektionskrankheiten, da etwa 95% aller Infektionen bereits durch die angeborene Immunität beseitigt werden können (Übersichtsartikel: Zinkernagel, R.M., 2003). Im Laufe der Evolution haben sich in zahlreichen Erregern jedoch Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, dem Angriff der angeborenen Immunität zu entkommen. In diesem Fall wird die adaptive Immunität aktiviert. Diese beiden eng miteinander verbundenen Komponenten bilden zusammen das Immunsystem der Vertebraten, dessen Aufgabe es ist, den Organismus vor eindringenden pathogenen Mikroorganismen, Viren und Tumoren zu schützen.

Das phylogenetisch ältere System der angeborenen Immunität besteht aus zellulären und biochemischen Abwehrmechanismen, die eine erste, sofortige Verteidigungslinie gegen eine Vielzahl an Mikroorganismen darstellen. Es besteht aus epithelialen Barrieren, zirkulierenden und sesshaften Zellen und Proteinen, die Mikroben oder deren produzierte Substanzen erkennen und Antworten einleiten, die diese Mikroben eliminieren. Die Zellen des angeborenen Immunsystems – Neutrophile, mononukleäre Phagozyten und natürliche Killer- (NK-) zellen – besitzen verschiedene keimbahnkodierte Rezeptoren, die Mikroben anhand ihrer pathogenassoziierten molekularen Muster erkennen. Diese innerhalb einer bestimmten Klasse von Mikroorganismen gleichen Strukturen kommen in mikrobiellen Membranen, Zellwänden, Proteinen und DNA vor und können als ein molekulares Zeichen des eindringenden Organismus betrachtet werden. Sie werden u.a. durch die evolutionär

konservierten Toll-ähnlichen Rezeptoren (*Toll-like receptors*, TLRs), oder kurz Toll-Rezeptoren, erkannt (Übersichtsartikel: Underhill, D.M. und A. Ozinsky, 2002). Durch dieses feste Rezeptorrepertoire, bedarf es keiner klonalen Vermehrung der Zellen, und die Immunantwort kann im Falle einer Infektion sehr schnell greifen.

Die adaptive Immunantwort basiert dagegen auf Lymphozyten, die spezifisch körperfremde Mikroorganismen und Moleküle (Antigene) erkennen und deren selektive Eliminierung induzieren können. Die Lymphozyten werden in zwei Hauptklassen unterteilt: die B- und T-Zellen. Jeder dieser ungeprägten (naiven) Lymphozyten, der nach der Entwicklung im Knochenmark (B-Zellen) bzw. im Thymus (T-Zellen) in die peripheren lymphatischen Organe gelangt, trägt einen Antigenrezeptor nur einer einzigen Spezifität. Da sich die Rezeptorspezifitäten der einzelnen Lymphozyten voneinander unterscheiden, bildet die Gesamtheit aller im Körper zirkulierender B- und T-Zellen ein sogenanntes Repertoire der Lymphozytenrezeptoren. Durch die große Anzahl naiver Lymphozyten mit unterschiedlichen Antigenrezeptoren ist es dem Immunsystem möglich, nahezu jedes beliebige Antigen zu erkennen. Trifft ein Lymphozyt auf das Antigen, das an seinen Rezeptor bindet, entweder in löslicher Form (B-Zellen) oder im Komplex mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) (T-Zellen), und erfährt zusätzlich stimulierende Signale, kommt es zur Aktivierung und damit zur Proliferation und Differenzierung dieses einen Lymphozyten. Diese klonale Selektion ist das zentrale Prinzip der adaptiven Immunität (Burnet, F.M., 1959). Die Differenzierung führt zu Effektorzellen. Im Fall von B-Zellen sind dies Plasmazellen, die Antikörper sezernieren, und im Fall von T-Zellen sind das zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T cells*, CTL) und T-Helferzellen (T_H-Zellen). Neben den Effektorzellen, die das Antigen beseitigen sollen, kommt es auch zur Bildung von Gedächtniszellen. Diese gewähren einen langanhaltenden, schnellwirkenden und spezifischen Schutz gegen eine erneute Infektion mit demselben Erreger. Diese Gedächtnisantwort ist die Basis für alle Vakzine, da durch eine Immunisierung die Bildung von antigenspezifischen, schnellwirkenden Gedächtniszellen induziert wird, ohne daß es zu einer gefährlichen Ausbreitung des Erregers kommt.

3.2.1 Initiierung einer Immunantwort

Das Schlüsselereignis für eine Immunantwort ist die Phase der Initiierung. Mikroorganismen, die die Hautbarrieren überwunden haben und in den Wirt eingedrungen

sind, müssen von diesem als fremd erkannt werden. Dieser Prozeß findet vorwiegend in nicht-lymphoiden Organen statt, in denen sich Makrophagen und Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) aufhalten. Diese gehören neben B-Zellen zu den antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs). Dendritische Zellen werden allgemein als die wichtigsten APCs betrachtet und als professionelle APCs bezeichnet, da sie besonders in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren (Inaba, K. *et al.*, 1990; Inaba, K. und R.M. Steinman, 1985; Levin, D. *et al.*, 1993). DCs repräsentieren eine heterogene Zellpopulation, die in der Maus in mindestens fünf verschiedene Gruppen eingeteilt werden kann (Übersichtsartikel: Shortman, K. und Y.J. Liu, 2002). Trotz der Unterschiede in Funktion und Lokalisierung der einzelnen DC-Untergruppen, besteht jedoch auch eine große funktionelle Plastizität zwischen den Gruppen. Während Vorläufer-DCs durch das Blut, die Lymphe und Lymphgewebe patrouillieren, residieren unreife DCs in den meisten peripheren Geweben, vor allem in der Haut und den Schleimhäuten (Übersichtsartikel: Banchereau, J. *et al.*, 2000). Die in der Haut ansässigen DCs sind die Langerhans-Zellen (Mohamadzadeh, M. *et al.*, 1993; Salomon, B. *et al.*, 1998). Die im peripheren Gewebe vorkommenden unreifen DCs nehmen permanent Selbst- und Nichtselbst-Antigen auf. Diese Antigenaufnahme kann durch Makropinozytose (Sallusto, F. *et al.*, 1995), rezeptorvermittelte Endozytose (Engering, A.J. *et al.*, 1997) oder Phagozytose erfolgen (Reis e Sousa, C. *et al.*, 1993). Internalisierte Antigene werden daraufhin in proteolytische Peptide prozessiert und auf Moleküle des MHC geladen. Gelangen diese MHC-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche, spricht man von Antigenpräsentation. Diese ist allerdings bei unreifen DCs noch sehr ineffizient. Im unreifen Stadium exprimieren sie auf ihrer Oberfläche nur wenig MHC-Moleküle und kostimulatorische Moleküle, die für eine effiziente T-Zellaktivierung benötigt werden (Mombaas, A.M. *et al.*, 1999; Tan, M.C. *et al.*, 1997). Stattdessen findet man auf der Zelloberfläche Rezeptoren wie DEC-205 (Jiang, W. *et al.*, 1995) und die Fc γ -Rezeptoren Typ I (CD64) und Typ II (CD32) (Fanger, N.A. *et al.*, 1996), über die große Mengen Antigene aufgenommen werden. Der Reifungsprozeß wird durch sogenannte „Gefahrensignale“ (Matzinger, P., 1998), die u.a. durch Toll-Rezeptoren erkannt werden, ausgelöst und transformiert die DCs in effiziente APCs und T-Zellaktivatoren. Dieser Prozeß geht einher mit der Wanderung der DCs aus dem peripheren Gewebe über die afferenten Lymphbahnen in benachbarte Lymphgewebe. In den ableitenden Lymphknoten werden reife DCs durch Chemokine in die parakortikalen Bereiche gelenkt, in der sich vorwiegend T-Zellen aufhalten (Dieu, M.C. *et al.*, 1998; Ngo, V.N. *et al.*, 1998). In diesem

Stadium können DCs weniger neue Antigene aufnehmen, beginnen aber vermehrt, MHC-Moleküle und kostimulatorische Moleküle zu exprimieren.

MHC-Moleküle sind Glykoproteine, die von einer Gruppe von Genen kodiert werden, die zusammen den Haupthistokompatibilitätskomplex bilden. Durch den genetisch kodierten Polymorphismus kommt es innerhalb eines Individuums zu einem bestimmten Spektrum an Peptiden, die gebunden werden können. Dadurch kann das Immunsystem auf eine Vielzahl unterschiedlicher Pathogene antworten. MHC-Klasse-I-Moleküle werden in unterschiedlichem Umfang konstitutiv auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. MHC-I-Moleküle bestehen aus einer α -Kette, die im MHC-Lokus kodiert ist und einer kleineren, nichtkovalent assoziierten Kette, dem β 2-Mikroglobulin, die nicht im MHC kodiert ist. MHC-II-Moleküle bestehen dagegen aus zwei im MHC kodierten Ketten, der α - und der β -Kette. Sie kommen in der Maus nur auf APCs und im Thymus vor. In beiden Fällen wird von den membrandistalen Domänen ein Spalt gebildet, worin dann die Bindung des Peptids erfolgt. Sowohl für MHC-I- als auch MHC-II-Moleküle gilt, daß die gebundenen Peptide einen integralen Bestandteil ihrer Struktur darstellen, ohne den sie instabil sind.

Auf MHC-I-Molekülen werden hauptsächlich Peptidfragmente intrazellulär synthetisierter und degradierter Proteine präsentiert. Auf MHC-II-Molekülen werden dagegen hauptsächlich Peptide gebunden, die durch den endosomalen Abbau extrazellulärer Proteine entstanden sind. DCs sind allerdings auch in der Lage, exogene Antigene aufzunehmen und auf MHC-I-Molekülen zu präsentieren. Dieser Mechanismus wird Kreuzpräsentation genannt (Kovacsovics-Bankowski, M. *et al.*, 1993; Norbury, C.C. *et al.*, 1997; Shen, Z. *et al.*, 1997).

3.2.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten werden anhand der beiden Glykoproteine CD4 und CD8 in zwei Klassen unterteilt, da sie nach ihrer Entwicklung im Thymus nur einen der beiden Korezeptoren exprimieren. 1974 wurde von Zinkernagel und Doherty nachgewiesen, daß CD8-T-Zellen virales Antigen nur erkennen, wenn es auf syngenen MHC-I-Molekülen präsentiert wird (Zinkernagel, R.M. und P.C. Doherty, 1974). Rosenthal und Shevach konnten kurz zuvor zeigen, daß CD4-T-Zellen nur aktiviert werden, wenn das Antigen auf MHC-II-Molekülen desselben Haplotyps präsentiert wird (Rosenthal, A.S. und E.M. Shevach, 1973). Dieses Prinzip der Antigenerkennung, daß ein Peptid nur von T-Zellen erkannt wird, wenn es an

ein körpereigenes MHC-Molekül gebunden ist, nennt man MHC-restringierte Antigenerkennung oder MHC-Restriktion. Da CD8-positive T-Zellen MHC-I-restringiert sind, erkennen deren T-Zellrezeptoren (*T cell receptors*, TCRs) Peptide nur im Komplex mit MHC-I-Molekülen. Diese T-Zellen sind CTL bzw. deren Vorläufer. CD4-positive T-Zellen sind MHC-II-restringiert und erkennen daher Peptide nur auf MHC-II-Molekülen. Diese T-Zelluntergruppe hat den funktionellen Phänotyp von T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen.

3.2.2.1 T-Zellaktivierung

Naive CD4-T-Zellen halten sich vorwiegend in den T-Zellbereichen der sekundären lymphatischen Organe – Lymphknoten, Milz und Peyerschen Plaques – auf (Mackay, C.R. *et al.*, 1996; Reinhardt, R.L. *et al.*, 2001). Naive CD8-T-Zellen, die noch nicht über zytotoxische Effektorfunktionen verfügen, zirkulieren fortlaufend zwischen dem Blut und den peripheren lymphatischen Organen. An ihren jeweiligen Aufenthaltsorten treffen CD4- und CD8-T-Zellen auf APCs, die ihnen im Komplex mit MHC-Molekülen körpereigene und körperfremde Peptide präsentieren. Die Wechselwirkungen zwischen T-Lymphozyten und Selbst-Peptid-MHC-Komplexen auf DCs stellen essentielle Überlebenssignale für die T-Zelle dar, ohne die sie apoptotisch werden würden (Brockner, T., 1997; Kirberg, J. *et al.*, 1997; Viret, C. *et al.*, 1999; Witherden, D. *et al.*, 2000). Die Aktivierung einer antigenspezifischen T-Zelle kann nur stattfinden, wenn sie ihr spezifisches Antigen auf MHC-Molekülen von APCs erkennt, da nur diese über die zur Aktivierung notwendigen kostimulatorischen Moleküle verfügen. Die wichtigste Rolle spielen dabei die Glykoproteine der B7-Familie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), die an den Rezeptor CD28 auf den T-Zellen binden. Die simultane Interaktion des TCRs mit dem Peptid-MHC-Komplex und der B7-Moleküle mit CD28 auf der T-Zelle löst die Aktivierung einer naiven T-Zelle aus, die letztendlich zur Differenzierung in eine Effektorzelle führt.

Die Bindung eines TCRs an einen Peptid-MHC-Komplex in Abwesenheit von Kostimulatoren führt zur Apoptose oder zur Anergie der T-Zelle. Anergische T-Zellen entwickeln sich nicht mehr zu Effektorzellen, wenn sie ein weiteres Mal auf dasselbe Antigen treffen. Auf diese Weise wird verhindert, daß autoreaktive T-Zellen gesundes körpereigenes Gewebe angreifen.

3.2.2.2 CD4-T-Zellen

Aktivierete CD4-T-Zellen wandern nach einer Proliferationsphase in den T-Zellregionen der sekundären lymphatischen Organe in die B-zellreichen Follikel ein (Gulbranson-Judge, A. und I. MacLennan, 1996; Kearney, E.R. *et al.*, 1994; Zheng, B. *et al.*, 1996). Dort kommen sie einer ihrer wichtigsten Aufgaben nach – der antigenabhängigen Hilfe bei der Antikörperproduktion.

Aktivierete T-Helferzellen werden anhand ihres Zytokinprofils in T_H1- und T_H2-Zellen unterteilt (Mosmann, T.R. *et al.*, 1986). T_H1-Zellen sezernieren IL-2, TNF-β und INF-γ und spielen eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von Viren und einigen intrazellulären Bakterien, wie z.B. *Listeria monocytogenes* (Dai, W.J. *et al.*, 1997; Harty, J.T. und M.J. Bevan, 1995). T_H2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5 und IL-13, was vorwiegend zur Aktivierung von Eosinophilen und Mastzellen, aber auch von B-Zellen führt. Diese Antwort ist wichtig für die Eliminierung von großen extrazellulären Parasiten, wie z.B. Helminthen, spielt aber auch bei Allergien eine Rolle. Die sezernierten Zytokine der jeweiligen Subpopulation haben auch einen Einfluß auf den produzierten Antikörpertyp der B-Zellen. Die Zytokine der T_H1-Zellen begünstigen (in der Maus) die Produktion der Ig-Isotypen IgG2a und IgG3, während eine T_H2-Antwort eher zur Produktion von IgG1 und IgE führt (Übersichtsartikel: DeKruyff, R.H. *et al.*, 1993). Die Entscheidung, ob es zu einer T_H1- oder T_H2-Antwort kommt, hängt von den Zytokinen ab, die während der frühen T-Zellaktivierung in der direkten Umgebung vorhanden sind. Befindet sich zum Zeitpunkt der Aktivierung IL-4 und eventuell IL-6 in der Umgebung, entsteht eine T_H2-Antwort, während von Makrophagen oder DCs sezerniertes IL-12 zu einer T_H1-Antwort führt.

Eine andere wichtige Untergruppe der CD4-T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen, die autoreaktive T-Zellen supprimieren und antigenspezifische Immunreaktionen kontrollieren (Übersichtsartikel: Asseman, C. und M. von Herrath, 2002).

3.2.2.3 CD8-T-Zellen

Die wichtigste Aufgabe von CD8-T-Zellen ist die Eliminierung von infizierten oder entarteten Zellen, wie sie z.B. bei Tumoren entstehen.

Eine durch APCs aktivierete CD8-T-Zelle sezerniert IL-2, welches sie zur klonalen Vermehrung benötigt. Nach etwa vier bis fünf Tagen in dieser extensiven

Proliferationsphase, synthetisiert die Zelle alle für ihre Funktion nötigen Effektormoleküle. Desweiteren verändert sich in dieser Phase die Expression einer Reihe von Oberflächenmolekülen, die für die Lokalisierung der Zelle eine wichtige Rolle spielen. Dadurch wird es der T-Zelle möglich, aus den lymphoiden Organen zu den Infektionsherden zu wandern. In der Proliferationsphase kommt es zu einer sehr starken Vermehrung der T-Zellen (Altman, J.D. *et al.*, 1996; Murali-Krishna, K. *et al.*, 1998). Mehrere Studien, darunter einige mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes*, konnten demonstrieren, daß eine vorübergehende Interaktion (min. 2h) einer naiven CD8-T-Zelle mit einer APC ausreicht, den kompletten linearen Entwicklungsweg, d.h. Expansion, Differenzierung, Kontraktion und Bildung von Gedächtniszellen, zu induzieren (Badovinac, V.P. *et al.*, 2002; Kaech, S.M. und R. Ahmed, 2001; Mercado, R. *et al.*, 2000; van Stipdonk, M.J. *et al.*, 2001). Es findet also bei der primären Aktivierung eine Programmierung der T-Zelle statt, wodurch deren weitere Entwicklung unabhängig von der Präsentation des Antigens durch APCs wird. Die Aktivierung einer CD4-T-Zelle benötigt hingegen einen längeren Kontakt zur APC (min. 6h), führt aber ebenso zu einem linearen Entwicklungsweg (Gett, A.V. und P.D. Hodgkin, 2000; Iezzi, G. *et al.*, 1998; Jelley-Gibbs, D.M. *et al.*, 2000).

Erkennt eine aktivierte CD8-T-Zelle ihr spezifisches Antigen auf einer infizierten Zelle, kann sie diese Zelle sofort durch Ausschüttung zytotoxischer Effektorproteine (Perforin und Granzyme) oder Fas-vermittelte Mechanismen töten, ohne daß dazu eine weitere Kostimulation erforderlich wäre. Desweiteren wirken CTL und auch T_H1-Zellen, indem sie Zytokine ausschütten. INF- γ z.B. hemmt die virale Replikation, führt zu einer verstärkten Expression von MHC-I-Molekülen und aktiviert ebenso wie TNF- α und TNF- β Makrophagen. TNF- α und TNF- β können außerdem durch Interaktion mit TNFR-I bei der Tötung einiger Zielzellen zusammenwirken (Übersichtsartikel: Dempsey, P.W. *et al.*, 2003).

3.2.3 B-Zellen und Antikörper

Die wichtigste Aufgabe von B-Zellen ist die Sekretion von Antikörpern. Sie erkennen ihr Antigen direkt, d.h. ohne Präsentation auf MHC-Molekülen. Die Antigenerkennung erfolgt über den B-Zellrezeptor (*B cell receptor*, BCR), den sie auf ihrer Oberfläche tragen. Da der BCR eine membrangebundene Form des Antikörpers ist, den die B-Zelle nach ihrer

Aktivierung und Differenzierung zur Plasmazelle sezerniert, haben der BCR und die sezernierten Antikörper dieser Zelle die gleiche Spezifität.

Antikörper sind Y-förmige Moleküle und bestehen aus jeweils zwei gepaarten schweren und leichten Polypeptidketten, wobei die variablen Bereiche einer schweren und einer leichten Kette die Antigenbindungsstelle darstellen. Somit hat jeder Antikörper zwei identische Bindungsstellen. Die Antikörper gehören zu der Familie der Immunglobuline (Ig), die anhand ihrer konstanten Regionen in fünf Klassen eingeteilt werden können: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Durch ihren speziellen Aufbau können Antikörper unterschiedliche Aufgaben erfüllen: Mit den Antigenbindungsstellen können lösliche Proteine, wie z.B. Toxine, oder Oberflächenproteine auf Pathogenen gebunden werden; mit den konstanten Bereichen können Zellen der angeborenen Immunität und das Komplementsystem¹ aktiviert werden. Zusammen mit dem Komplementsystem können Antikörper extrazelluläre Bakterien opsonisieren und so für die Zerstörung durch neutrophile Zellen und Makrophagen vorbereiten.

3.2.4 Das immunologische Gedächtnis

Unabhängig von dem Typ der Immunantwort ist die Induktion einer langanhaltenden Gedächtnisantwort das Ziel fast aller Vakzine.

Die Gedächtniszellpopulationen unterscheiden sich qualitativ und quantitativ von denen, die noch nicht mit „ihrem“ Antigen in Kontakt gekommen sind (Beverley, P.C. und M.K. Maini, 2000). Das immunologische Gedächtnis besteht demnach aus expandierten Lymphozytenklonen mit veränderten Eigenschaften. Die wichtigste Eigenschaft von Gedächtnis-B-Zellen ist die Produktion von somatisch mutierten, hochaffinen Antikörpern der IgG-Klasse (MacLennan, I.C. *et al.*, 2000). Durch jeden weiteren Antigenkontakt steigt sowohl die Affinität als auch die Menge der Antikörper weiter an.

Im Vergleich zu naiven T-Zellen sind Gedächtnis-T-Zellen sensitiver gegenüber geringen Antigenmengen, weniger abhängig von Kostimulation, synthetisieren schneller Zytokine und differenzieren schneller zu Effektorzellen (Bachmann, M.F. *et al.*, 1999; Cho, B.K. *et al.*, 1999; Garcia, S. *et al.*, 1999; Iezzi, G. *et al.*, 2001; Kedl, R.M. und M.F. Mescher, 1998; Rogers, P.R. *et al.*, 2000; Veiga-Fernandes, H. *et al.*, 2000; Zimmermann, C. *et al.*,

¹ Eine Gruppe von Plasmaproteinen, die in einer kaskadenartigen Reaktion aktiviert werden und gemeinsam extrazelluläre Erreger angreifen.

1999). Gedächtnis-T-Zellen wurden zudem von Sallusto *et al.* in zwei phänotypisch und funktionell distinkte Subpopulationen eingeteilt (Sallusto, F. *et al.*, 1999). Für das Überleben von Gedächtnis-T-Zellen ist der Kontakt zum Antigen nicht unbedingt notwendig (Murali-Krishna, K. *et al.*, 1999; Swain, S.L. *et al.*, 1999). In einigen chronischen Infektionen begünstigt die Antigenpräsenz allerdings das Überleben der Gedächtniszellen (Maini, M.K. *et al.*, 2000). Eine starke primäre klonale Expansion führt außerdem zu einer länger anhaltenden Gedächtnisantwort (Übersichtsartikel: Doherty, P.C. *et al.*, 1996).

Insofern gibt es zwei Alternativen bei der Entwicklung einer Vakzine, um möglichst effektiv die Bildung von Gedächtniszellen zu induzieren. Entweder muß die Impfung zu einer möglichst starken klonalen Expansion führen, oder es wird ein Vektor gewählt, der eine lange Persistenz des Antigens garantiert.

3.3 Impfstofftechnologien

Alle bisher wirksamen Vakzine induzieren neutralisierende oder opsonisierende Antikörper, die die systemische Verbreitung des Pathogens oder die Wirkung von Exotoxinen verhindern (Übersichtsartikel: Zinkernagel, R.M., 2003). Starke humorale Immunantworten können durch Impfungen mit Proteinuntereinheiten oder inaktivierten Pathogenen induziert werden (Tabelle 3.2). Da die prozessierten Peptide allerdings hauptsächlich auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden und nur geringe Mengen über den Weg der Kreuzpräsentation auf MHC-I-Moleküle gelangen, eignen sich solche Impfstoffe nur bedingt, um CTL-Antworten zu induzieren. Die Wirksamkeit dieser traditionellen Vakzine ist daher auf einige Infektionskrankheiten limitiert.

Es besteht allgemeines Einverständnis darüber, daß Impfstoffe gegen die meisten chronischen Infektionen, ausgelöst durch intrazelluläre Erreger, sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten, vor allem CTL-Antworten, induzieren müssen, um neue Zellinfektionen zu vermeiden und infizierte Zellen zu eliminieren (Doherty, P.C. und R.M. Zinkernagel, 1974; Klein, M., 2001; Seder, R.A. und A.V. Hill, 2000; Zinkernagel, R.M., 1996). Ähnlich wie bei einer natürlichen Infektion mit einem intrazellulären Erreger kommt es bei Impfungen mit lebenden, attenuierten¹ Vakzinen zu einer Produktion der Antigene

¹ Durch Kultivierung in nichtmenschlichen Zellen oder durch gezielte Mutation von Virulenzgenen erzeugte Abschwächung eines Erregers.

im Zytosol, so daß die Peptide auch auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden können. Lebende, abgeschwächte Erreger induzieren zwar sehr effektiv Antikörper- und T-Zellantworten, können allerdings nur bedingt als Massenimpfstoffe eingesetzt werden. Trotz der zahlreichen eingeführten Mutationen, können attenuierte Erreger noch langsam im Menschen replizieren und so durch erneute Mutationen oder Rekombinationen ihre Virulenz wiedererlangen. Besonders für Menschen mit einer Immunschwäche stellen diese Impfstoffe daher ein erhöhtes Risiko dar.

In den letzten Jahrzehnten wurden jedoch Impfstofftechnologien entwickelt, die sicherer sind und starke zelluläre Immunantworten induzieren können (Tabelle 3.2): DNA-Vakzine und rekombinante virale Vektoren.

Tabelle 3.2: Vergleich von Impfstofftechnologien

	Protein- untereinheiten	rekombinante virale Vektoren	DNA-Vakzine
Immunantwort:			
-Humoral B-Zellen	+++	+	+++
-Zellulär T _H -Zellen	+/- T _H 2	+/- T _H 1	+++ T _H 1 ^a /T _H 2 ^b
CTL	+/-	++++	+++
Antigenpräsentation	MHC-II	MHC-I & MHC-II	MHC-I & MHC-II
Gedächtnis	+/-	+++	+++
Entwicklung und Produktion	++	+	++++
Kosten	hoch	hoch	niedrig
Transport und Lagerung	+++	+	+++
Sicherheit	++++	++	+++

^aintramuskulär; ^bGene Gun

- schlecht, +/- schwach, + mäßig, ++ gut, +++ sehr gut, ++++ hervorragend

3.3.1 DNA-Vakzine

1990 wurde von Wolff *et al.* gezeigt, daß die intramuskuläre Injektion von Plasmid-DNA zur Expression verschiedener Reportergene in Muskelzellen führt (Wolff, J.A. *et al.*, 1990). Nachdem von Tang *et al.* nachgewiesen wurde, daß die Injektion von Plasmid-DNA eine antigenspezifische Antikörperantwort gegen ein kodiertes Protein induzierte (Tang, D.C. *et al.*, 1992), demonstrierten Ulmer *et al.* und Robinson *et al.*, daß die Impfung mit DNA, die für Influenza Haemagglutinin kodiert, Mäuse (Ulmer, J.B. *et al.*, 1993) bzw. Hühner

(Robinson, H.L. *et al.*, 1993) vor einer Infektion mit Influenzaviren schützen kann. In der Mausstudie wurde desweiteren nachgewiesen, daß die DNA-Immunsierung zu einer Antikörper- und CTL-Antwort führte (Ulmer, J.B. *et al.*, 1993). Insofern stellt die Immunsierung mit Plasmid-DNA eine einfache Alternative zu Peptidimpfstoffen oder lebend-attenuierten Organismen dar. DNA-Vakzine bestehen lediglich aus Plasmiden, die aus Bakterien gewonnen werden und neben dem bakteriellen Replikationsursprung und dem Gen für die Antibiotikaresistenz einen eukaryotischen Promotor, das Gen für das gewünschte Antigen und eine Polyadenylierungssequenz enthalten. Aus diesem Grund sind diese Vakzine sehr viel einfacher herzustellen und zu manipulieren als z.B. lebend-attenuierte Viren. DNA-Vakzinen eignen sich nicht nur als prophylaktische Impfstoffe gegen Mikroorganismen, sondern auch als therapeutische Impfstoffe zur Bekämpfung von Krebs, Autoimmunkrankheiten oder Allergien (Übersichtsartikel: Gurunathan, S. *et al.*, 2000).

Die Antigenprozessierung und -präsentation nach einer DNA-Vakzinierung erfolgt ähnlich wie nach einer Virusinfektion, da das Antigen in beiden Fällen intrazellulär synthetisiert wird und damit über den MHC-I-Weg präsentiert werden kann.

Die Art der transfizierten Zellen hängt von der verwendeten Methode der Impfung ab. Bei der intramuskulären Immunsierung werden hauptsächlich Myozyten transfiziert, die zwar MHC-I-Moleküle exprimieren, jedoch keine kostimulatorischen Moleküle. Daher scheint es unwahrscheinlich, daß T-Zellen allein durch diese transfizierten Muskelzellen aktiviert werden. Dies konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden. Demzufolge produzieren Myozyten nach einer intramuskulären Immunsierung zwar das Antigen, die Aktivierung der T-Zellen erfolgt allerdings durch APCs in drainierenden Lymphknoten (Corr, M. *et al.*, 1996; Corr, M. *et al.*, 1999; Fu, T.M. *et al.*, 1997; Ulmer, J.B. *et al.*, 1996). Dazu müssen die APCs nicht selbst transfiziert sein, d.h. es findet eine Kreuzpräsentation des Antigens statt (Fu, T.M. *et al.*, 1997; Ulmer, J.B. *et al.*, 1996). Die entscheidende Rolle von DCs bei der T-Zellaktivierung wurde primär durch die Verwendung von Knochenmarkschimären demonstriert (Corr, M. *et al.*, 1996; Doe, B. *et al.*, 1996; Iwasaki, A. *et al.*, 1997).

Bei einer anderen Methode wird die DNA auf Goldpartikel geladen, die mit einer sogenannten *Gene Gun* in die Epidermis geschossen werden. In diesem Fall werden hauptsächlich Keratinozyten und Langerhanszellen transfiziert (Raz, E. *et al.*, 1994; Yang, N.S. *et al.*, 1990). Wird das so behandelte Hautareal direkt nach der *Gene Gun*-Immunsierung entfernt, wird die Entwicklung einer Immunantwort verhindert (Torres, C.A. *et al.*, 1997). In einer anderen Studie wurde gezeigt, daß eine Transplantation

transfizierter Haut innerhalb von zwölf Stunden nach der Vakzinierung eine Immunantwort in naiven Tieren induzieren kann (Klinman, D.M. *et al.*, 1998). Findet die Transplantation allerdings erst 24 Stunden nach der Immunisierung statt, entwickelt sich keine Immunantwort mehr. Diese Studien deuten darauf hin, daß Zellen, die innerhalb von 24 Stunden aus der Epidermis auswandern, für die Induktion der primären Immunantwort verantwortlich sind. Dies wurde auch durch direkte *in vivo* Visualisierung von Lymphknoten nach *Gene Gun*-Immunisierung bestätigt (Condon, C. *et al.*, 1996). Dabei wurde gezeigt, daß die Expression eines Reportergens in DCs stattfindet. Demnach wandern einige wenige (0,4%) direkt transfizierte DCs (Akbari, O. *et al.*, 1999; Casares, S. *et al.*, 1997; Porgador, A. *et al.*, 1998) aus der Haut in die Lymphknoten und induzieren dort die primäre Immunantwort. Transfizierte somatische Zellen, wie Keratinozyten, scheinen ein Antigenreservoir darzustellen, welches das Ausmaß und die Dauer der Antwort beeinflusst (Akbari, O. *et al.*, 1999; Klinman, D.M. *et al.*, 1998). In einer weiteren Studie, bei der gewebespezifische Promotoren eingesetzt wurden, war dagegen hauptsächlich die Kreuzpräsentation für die Initiation, das Ausmaß und die Dauer einer CD8-T-Zellantwort verantwortlich (Cho, J.H. *et al.*, 2001). Der Einfluß auf die Immunantwort von direkt transfizierten APCs war in dieser Studie eher gering.

Wie bereits erwähnt, benötigen DCs ein „Gefahrensignal“, um zu einer effektiven APC zu reifen (Matzinger, P., 1998). Im Fall der DNA-Vakzinierung, bei der außer dem reinen Plasmid keine mikrobiellen Produkte wie z.B. LPS vorhanden sind, stellt die bakterielle DNA die einzige Quelle für ein solches Signal dar. Verantwortlich für den immunogenen Stimulus ist dabei ein bestimmtes Sequenzmotiv. Dieses Motiv besteht aus einem nichtmethylierten Cytidin-Phosphat-Guanosin- (CpG-) Dinukleotid, idealerweise flankiert von zwei 5' Purinen und zwei 3' Pyrimidinen (Krieg, A.M. *et al.*, 1995; Sato, Y. *et al.*, 1996). Dieses Motiv kommt zwanzigmal häufiger in mikrobieller als in Säuger-DNA vor (Cardon, L.R. *et al.*, 1994; Razin, A. und J. Friedman, 1981) und wird über den TLR9 erkannt (Hemmi, H. *et al.*, 2000). Synthetische Oligonukleotide mit dem CpG-Motiv haben dieselben immunstimulatorischen Eigenschaften wie bakterielle DNA. Die systemische Injektion solcher Oligonukleotide fördert indirekt die Aktivität von NK-Zellen (Cowdery, J.S. *et al.*, 1996), regt B-Zellen zur Proliferation oder zur Antikörperproduktion an (Krieg, A.M. *et al.*, 1995) und induziert die Synthese der T_H1-typischen Zytokine IL-6, IL-12, INF- γ und TNF- α durch Makrophagen und DCs (Jakob, T. *et al.*, 1998; Klinman, D.M. *et al.*, 1996; Sparwasser, T. *et al.*, 1997; Stacey, K.J. *et al.*, 1996). Desweiteren führt die intradermale Injektion von CpG-Oligonukleotiden zur Migration und Reifung von

Langerhanszellen aus der Epidermis in die Lymphknoten, was wiederum einen Beweis für die essentielle Rolle von DCs für die DNA-Immunsierung darstellt (Ban, E. *et al.*, 2000). Das CpG-Motiv stellt demnach das „Gefahrensignal“ dar, welches die Zellen der angeborenen Immunität erkennen und dazu veranlaßt, proinflammatorische Zytokine zu sezernieren. Im Fall der *Gene Gun*-Immunsierung wird das Aktivierungssignal vermutlich durch einige Zellen geliefert, die durch den physikalischen Reiz der Goldpartikel zerstört wurden (Weiss, R. *et al.*, 2002). Eine Interaktion zwischen dem TLR9 auf Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ERs) (Latz, E. *et al.*, 2004) und den CpG-Motiven ist bei dieser Methode vermutlich nicht möglich.

Die Fähigkeit bakterieller DNA, eine T_H1 -Antwort zu induzieren, ließ die DNA-Vakzinierung als besonders vielversprechend erscheinen, um einen Immunschutz gegen intrazelluläre Erreger zu erreichen. In der Tat konnte in mehreren Infektionsmodellen gezeigt werden, daß die durch DNA-Impfung ausgelöste T_H1 -Antwort Mäuse vor Infektionen mit *Leishmania major*, *Plasmodium falciparum*, *Mycobakterium tuberculosis* oder *Listeria monocytogenes* schützen kann (Übersichtsartikel: Donnelly, J.J. *et al.*, 1997). In mehreren Fällen konnte die alleinige DNA-Immunsierung allerdings keinen Immunschutz gewährleisten. Um die Immunantwort zu steigern, wurde deshalb die sogenannte *prime/boost*-Strategie angewendet, bei der eine erste Impfung (*prime*) mit DNA erfolgt und nach einiger Zeit eine zweite Impfung (*boost*) mit Protein oder viralen Vektoren durchgeführt wird (An, L.L. *et al.*, 1996; Feng, C.G. *et al.*, 2001; McConkey, S.J. *et al.*, 2003; McShane, H. *et al.*, 2001; Tanghe, A. *et al.*, 2001; Yoshida, A. *et al.*, 2001).

Obwohl gezeigt wurde, daß die Injektion bakterieller DNA T_H1 -Antworten induzieren kann, hängt die Qualität der Immunantwort von der Immunsierungsmethode ab. Während die intramuskuläre Immunsierung eine T_H1 -Antwort hervorruft (Feltquate, D.M. *et al.*, 1997), induziert die *Gene Gun*-Immunsierung vorwiegend eine T_H2 -Antwort (Torres, C.A. *et al.*, 1997). Dies spiegelt sich in den entsprechenden Zytokinprofilen und den synthetisierten Antikörperisotypen wieder. Nach intramuskulärer Immunsierung findet man hauptsächlich den Isotyp IgG2a (Feltquate, D.M. *et al.*, 1997) und nach *Gene Gun*-Immunsierung hauptsächlich IgG1 (Pertmer, T.M. *et al.*, 1996).

Neben der Immunsierungsmethode hat auch die zelluläre Lokalisierung des exprimierten Antigens einen Einfluß auf die Art und Stärke der Immunantwort. Vergleichende Studien, in denen DNA-Immunsierungen mit Plasmiden durchgeführt wurden, die sezernierte oder membranständige Antigene kodierten, kamen allerdings zu unterschiedlichen Resultaten (Boyle, J.S. *et al.*, 1997b; Drew, D.R. *et al.*, 2000; Torres, C.A. *et al.*, 1999). Diese Studien zeigten darüberhinaus, daß neben der Immunsierungsmethode und der zellulären

Lokalisierung des Antigens auch die spezifischen Eigenschaften des Antigens die Immunantwort beeinflussen.

Eine weitere Möglichkeit, die durch eine DNA-Immunisierung ausgelöste Immunantwort zu beeinflussen, besteht in der Möglichkeit der Koexpression von Zytokinen, Chemokinen oder kostimulatorischen Molekülen (Boyle, J.S. *et al.*, 1998; Gurunathan, S. *et al.*, 1998; Kim, J.J. *et al.*, 1999; Kim, J.J. *et al.*, 1998; Lewis, P.J. *et al.*, 1997; Maecker, H.T. *et al.*, 1997; Prayaga, S.K. *et al.*, 1997).

Da die DNA-Immunisierung per *Gene Gun* verlässlichere Ergebnisse liefert und mit einer sehr viel geringeren DNA-Menge deutlich stärkere Immunantworten induziert als die intramuskuläre DNA-Immunisierung (Boyle, J.S. *et al.*, 1997b; Haynes, J.R. *et al.*, 1996; Torres, C.A. *et al.*, 1999; Yoshida, A. *et al.*, 2000), wurden zahlreiche Methoden entwickelt und untersucht, um auch mit der *Gene Gun*-Immunisierung eine T_H1-Antwort zu induzieren. So konnte z.B. gezeigt werden, daß die Injektion von CpG-Oligonukleotiden trotz einer bestehenden T_H2-Antwort eine T_H1-Antwort induzieren kann (Zimmermann, S. *et al.*, 1998). Wird für die Immunisierungen das *prime/boost*-Prinzip angewendet, scheint ein längeres Intervall zwischen den beiden Immunisierungen zu einer T_H1-Polarisierung zu führen (Fensterle, J. *et al.*, 1999). Für die T_H1/T_H2-Balance scheint aber auch der genetische Hintergrund des jeweiligen Mausstamms mitentscheidend zu sein (Creusot, R.J. *et al.*, 2003; Creusot, R.J. *et al.*, 2001).

Aufgrund der zahlreichen und vielversprechenden Ergebnisse von DNA-Immunisierungsversuchen in Mäusen, wurden auch eine Reihe präklinischer Studien am Menschen durchgeführt. Während die Sicherheit von DNA-Vakzinen demonstriert und humorale und zelluläre Immunantworten induziert werden konnten, waren die Ergebnisse insgesamt eher enttäuschend (Calarota, S.A. *et al.*, 2001; Calarota, S.A. *et al.*, 1999; Le, T.P. *et al.*, 2000; MacGregor, R.R. *et al.*, 2000; MacGregor, R.R. *et al.*, 1998; Roy, M.J. *et al.*, 2000; Wang, R. *et al.*, 2001). Aus diesem Grund gibt es weiterhin Bestrebungen, DNA-Vakzine für den Gebrauch am Menschen zu optimieren.

3.3.2 Virale Vektoren

Neben der Administration von DNA-Plasmiden stellen virale Vektoren ein weiteres System der genetischen Immunisierung dar. Im Laufe der Evolution haben sich in Viren eine Vielzahl verschiedenster Strategien entwickelt, ihr Genom sehr effektiv in die Zellen ihres Wirtsorganismus zu schleusen. Innerhalb der Zelle werden die zelleigenen Transkriptions-

und Translationsmechanismen ausgenutzt, um die virale Replikation zu ermöglichen. Die Replikation des Virus führt letztendlich zur Zerstörung der Zelle und zu einem neuen Infektionszyklus. Bei der Konstruktion viraler Vektoren wurden diese beiden Ereignisse, nämlich Infektion und Replikation, voneinander getrennt. Um dies zu erreichen, werden einige oder alle kodierenden Regionen des viralen Genoms deletiert, wobei die Sequenzen, die für die Verpackung des Genoms in die Virushülle oder die Integration des Genoms in das zelluläre Chromatin benötigt werden, intakt gelassen werden. Die Expressionskassette mit dem gewünschten Transgen kann dann anstelle der deletierten Sequenzen in das virale Rückgrat inseriert werden. Die deletierten Gene des Virus, die zur Bildung des Virions oder für die Replikation benötigt werden, werden in *trans* zur Verfügung gestellt. Dies kann entweder durch stabil transfizierte Zelllinien oder durch die Kotransfektion mit einem sogenannten Helfervirus erfolgen. Mit dem Vektorgenom und eventuell dem Verpackungskonstrukt transfizierte Zellen produzieren *in vitro* die rekombinanten Vektorpartikel. Aufgereinigte Vektorpartikel können anschließend zur *in vivo* Immunisierung verwendet werden. Dieses Verfahren ist bei allen zur Zeit verwendeten viralen Vektoren im Prinzip gleich.

Heutzutage wird der Einsatz viraler Vektoren zur Behandlung verschiedenster Krankheiten, wie beispielsweise Krebs, neurodegenerative Störungen, kardiovaskuläre und infektiöse Krankheiten, untersucht. (Übersichtsartikel: Thomas, C.E. *et al.*, 2003). Die genetische Immunisierung unterscheidet sich von der Gentherapie lediglich durch ihren prophylaktischen Charakter. Aufgrund der Vielzahl und der Diversität der möglichen Behandlungsziele gibt es keinen Vektor, der für alle Anwendungen gleichermaßen geeignet ist. Zur Zeit werden hauptsächlich fünf verschiedene Klassen von viralen Vektoren verwendet, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen, je nachdem ob ihr Genom in das zelluläre Chromatin inseriert wird (Onkoretroviren und Lentiviren), oder ob es extrachromosomal als Episom im Zellkern persistiert (Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren (AAVs) und Herpesviren). Die Hauptmerkmale dieser Vektoren sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt.

Tabelle 3.3: Merkmale der Hauptgruppen viraler Vektoren

Vektor	Art des Genom	Transgenkapazität	Tropismus	Inflammatorisches Potential	Form des Genoms	Limitierungen	Vorteile
Onkoretrovirus	RNA	8 kb	sich teilende Zellen	gering	integriert	transduziert nur sich teilende Zellen; Integration könnte Onkogenese induzieren	dauerhafter Gentransfer in sich teilende Zellen
Lentivirus	RNA	8 kb	breit	gering	integriert	Integration könnte Onkogenese induzieren	dauerhafter Gentransfer in die meisten Geweben
Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1)	dsDNA	40 kb ^a 150 kb ^b	breit, besonders Neurone	hoch	episomal	inflammatorisch; transiente Genexpression außer in Neuronen	große Transgenkapazität; besonders starker Tropismus für Neuronen
Adenovirus	dsDNA	8 kb ^a 30 kb ^c	breit	hoch	episomal	Capsid induziert starke inflammatorische Antwort	sehr effiziente Transduktion der meisten Gewebe
AAV	ssDNA	<5 kb	breit	gering	episomal (>90%)	geringe Transgenkapazität	nicht-inflammatorisch; nicht-pathogen

^aReplikationsinkompetent, ^bAmplikon, ^cHelferabhängig

Quelle: (Thomas, C.E. *et al.*, 2003), verändert.

Während bei der Gentherapie möglichst eine von Immunsystem des Empfängers unbemerkte Genexpression stattfinden soll, ist eine inflammatorische Reaktion auf den viralen Vektor bei einer Impfung durchaus erwünscht. Der immunstimulatorische Effekt des Viruspartikels induziert die Aktivierung und Reifung der APCs und die damit verbundenen Zytokinausschüttungen. Nur dadurch kann es, wie bereits beschrieben, zur Bildung einer adaptiven Immunantwort und des spezifischen Gedächtnisses kommen. Da Adenoviren und Herpesviren ein hohes inflammatorisches Potential besitzen, eignen sie sich besonders als Impfstoffvektoren. Desweiteren können sie eine Vielzahl verschiedener Zelltypen infizieren, darunter auch die für die Initiierung einer Immunantwort wichtigen DCs (Coffin, R.S. *et al.*, 1998; Kruse, M. *et al.*, 2000; Mikloska, Z. *et al.*, 2001; Salio, M. *et al.*, 1999; Samady, L. *et al.*, 2003). Für die Transduktion mit rekombinanten Adenoviren wird allerdings im Gegensatz zu Herpes Simplex Viren Typ-1 (HSV-1) eine sehr hohe Virusdosis benötigt (Coffin, R.S. *et al.*, 1998; Song, W. *et al.*, 1997; Zhong, L. *et al.*, 1999). Das Vektorgenom persistiert in beiden Fällen episomal, so daß keine Gefahr der

Onkogenese besteht. Der besondere Vorteil der HSV-1-Vektoren liegt in der Möglichkeit, sehr große oder mehrere Transgene in das Vektorgenom zu inserieren. Diese Vorteile lassen HSV-1 als potenten Vektor für genetische Immunisierungen erscheinen.

3.3.2.1 HSV-1-Vektoren

HSV-1 ist ein umhülltes Virus mit einem 152 kb großen doppelsträngigen DNA-Genom (Abb. 3.1). In dem Genom befinden sich 84 Gene, die, je nachdem, ob sie für die virale Replikation benötigt werden oder nicht, in essentielle und nicht-essentielle Gene eingeteilt werden können. Nach einer Infektion durchläuft das Virus einen lytischen Replikationszyklus in den infizierten Epithelialzellen. Die neugebildeten Virionen können über die Axone in innervierende sensorische Neuronen eindringen, in denen das Nukleocapsid inklusive Tegument zum Soma transportiert wird. Das virale Genom und das Protein VP16 aus dem Tegument gelangen in den Nukleus. An diesem Punkt kann eins von zwei Szenarien eintreten: Entweder findet ein erneuter lytischer Replikationszyklus statt, oder aber die virale DNA verbleibt in einem latenten Status. In der Latenzphase persistiert das Genom als ein stabiles episomales Element. Dieser Status kann lebenslang anhalten (Mellerick, D.M. und N.W. Fraser, 1987). In der Latenzphase werden außer bestimmten nichttranslatierten RNA-Spezies keine virale Gene exprimiert (Croen, K.D. *et al.*, 1987; Rock, D.L. *et al.*, 1987; Stevens, J.G. *et al.*, 1987). Verändern sich die Interaktionen zwischen Wirt und Virus, z.B. durch zellulären Streß, kann das Virus reaktiviert werden und ein erneuter lytischer Zyklus beginnt. Während eines lytischen Zyklus werden die Gene in einer zeitlich genau regulierten Abfolge exprimiert (Honess, R.W. und B. Roizman, 1974; Honess, R.W. und B. Roizman, 1975). Zunächst werden die sehr frühen (*immediate early*, IE-) Gene *ICP0*, *ICP4*, *ICP22*, *ICP27* und *ICP47* exprimiert. Die Genprodukte ICP4 und ICP27 sind essentiell für die Expression der frühen (*early*, E-) und späten (*late*, L-) Gene und damit für die Virusreplikation (DeLuca, N.A. *et al.*, 1985; Dixon, R.A. und P.A. Schaffer, 1980; Sacks, W.R. *et al.*, 1985).

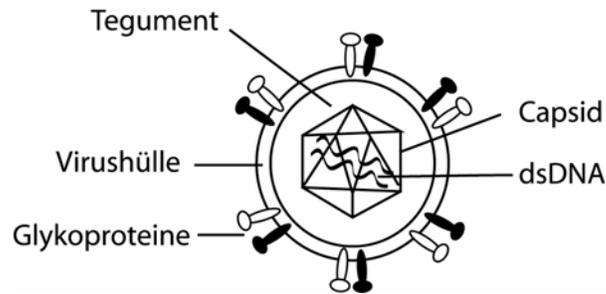


Abb. 3.1 Schematische Darstellung eines HSV-1-Virions

Um HSV-1 als sicheren Vektor für gentherapeutische Ansätze, inklusive der genetischen Immunisierung, nutzen zu können, muß der für die meisten Zellen tödlich endende Replikationszyklus nach dem Eintritt in die Zelle gestoppt werden. Da die Virusreplikation von der Expression der IE-Gene *ICP4* und *ICP27* abhängig ist, können replikationsinkompetente Vektoren durch die Inaktivierung eines der beiden Gene generiert werden (DeLuca, N.A. *et al.*, 1985). Allerdings wurde festgestellt, daß eine *ICP4*-Nullmutante weiterhin zytotoxisch ist, obwohl sie nicht mehr replizieren kann (Johnson, P.A. *et al.*, 1994; Samaniego, L.A. *et al.*, 1998; Wu, N. *et al.*, 1996). Um die Zytotoxizität der IE-Gene zu vermeiden, wurden Vektoren mit Deletionen mehrerer IE-Gene konstruiert (Krisky, D.M. *et al.*, 1998; Samaniego, L.A. *et al.*, 1998; Samaniego, L.A. *et al.*, 1997). Die Deletion der IE-Gene führt zu einem Abbruch der lytischen Gentranskription und damit zu einem latenzähnlichen Status (Krisky, D.M. *et al.*, 1998). Durch verschiedene Studien (Jordan, R. und P.A. Schaffer, 1997; Krisky, D.M. *et al.*, 1998; Samaniego, L.A. *et al.*, 1998; Samaniego, L.A. *et al.*, 1997) wurde festgestellt, daß Dreifachmutanten (*ICP4*:*ICP22*:*ICP27*) für die meisten Anwendungen am geeignetsten sind. Diese Vektoren zeigen *in vitro* und *in vivo* minimale Zytotoxizität, sind effiziente „Genfähren“, und es können in *ICP4*- und *ICP27*-komplementierenden Zellkulturen hohe Vektortiter generiert werden (Krisky, D.M. *et al.*, 1998; Wu, N. *et al.*, 1996). Eine solche Dreifachmutante, konstruiert von P. Marconi (Universität Ferrara, Italien), wurde auch für die Versuche der vorliegenden Arbeit verwendet. Die Expressionskassette wurde in den *U_L41*-Lokus des Virusgenoms inseriert. Das Genprodukt des *U_L41*-Gens ist das *virion host shut-off protein* (vhs). Dieses Protein dient, wie *ICP47* (York, I.A. *et al.*, 1994), der Vermeidung einer adaptiven Immunantwort auf die HSV-Infektion (Kwong, A.D. *et al.*, 1988; Smibert, C.A. *et al.*, 1992). Kürzlich wurde zudem gezeigt, daß vhs für die Inaktivierung von DCs nach

einer HSV-1-Infektion verantwortlich ist (Kruse, M. *et al.*, 2000; Mikloska, Z. *et al.*, 2001; Salio, M. *et al.*, 1999). Durch die Insertion der Expressionskassette wurde der offene Leserahmen des U_L41-Gens zerstört und damit eine effektive Antigenpräsentation auf DCs gewährleistet.

Rekombinante HSV-1-Vektoren wurden in mehreren Studien als Impfstoff gegen Herpesinfektionen (Farrell, H.E. *et al.*, 1994; Morrison, L.A. und D.M. Knipe, 1994; Morrison, L.A. und D.M. Knipe, 1996) und als gentherapeutische (Übersichtsartikel: Wakimoto, H. *et al.*, 2003) oder onkolytische (Übersichtsartikel: Latchman, D.S., 2001) Vektoren eingesetzt. Das Potential von replikationsinkompetenten HSV-1-Vektoren, antigenspezifische Immunantworten gegen das Genprodukt eines Transgens zu induzieren, wurde allerdings erst in wenigen Studien demonstriert (Brubaker, J.O. *et al.*, 1996; Murphy, C.G. *et al.*, 2000).

3.3.2.2 HSV-1 Amplikons

HSV-1-Amplikons stellen eine einzigartige Kombination der Vorteile einer DNA-Plasmidimmunisierung und des effizienten viralen Gentransfers dar. Sie bestehen aus einem bakteriellen Plasmid, welches als Concatemer¹ in HSV-1-Virionen verpackt wird. Damit das Amplikonplasmid in eukaryotischen Zellen repliziert und verpackt werden kann, enthält es die nichtkodierenden Sequenzen des DNA-Replikationsursprungs *ori* und des Verpackungssignals *pac* von HSV-1 (Fraefel, C. *et al.*, 1996; Spaete, R.R. und N. Frenkel, 1982). Um das Plasmid in *Escherichia coli* vermehren und manipulieren zu können, enthält es zudem den bakteriellen Replikationsursprung *colE1* und ein Ampizillin-Resistenzgen. In ein solches Plasmid können Expressionskassetten mit einer Größe von bis zu 130 kb kloniert werden (Wade-Martins, R. *et al.*, 2003; Wade-Martins, R. *et al.*, 2001), da das HSV-1-Genom 152 kb umfaßt und exakt diese Menge an DNA immer in ein HSV-1-Virion verpackt wird (Roizman, B.u.S., A. E., 1996). Ist das zu verpackende Amplikonplasmid kleiner, werden Concatemere mit einer Größe von 152 kb gebildet und verpackt.

Amplikonplasmide sind abhängig von Helferviren, da sie keine kodierenden Virussequenzen besitzen. Die Gene für die viralen Proteine des Partikels und der Replikationsmaschinerie müssen deshalb *in trans* zur Verfügung gestellt werden. Diese Funktion kann durch replikationsinkompetente HSV-1-Mutanten, ein Set an überlappenden

¹ Aneinandergereihte DNA-Einheiten

Cosmiden oder bakteriellen, künstlichen Chromosomen (*bacterial artificial chromosomes*, BACs) übernommen werden (Fraefel, C. *et al.*, 1996; Saeki, Y. *et al.*, 2001; Saeki, Y. *et al.*, 1998; Stavropoulos, T.A. und C.A. Strathdee, 1998). Die Cosmide oder BACs enthalten in diesem Fall ein verpackungsunfähiges Virusgenom. Durch die Kotransfektion eukaryotischer Zellen mit den Cosmiden oder BACs und dem Amplikonplasmid können helfervirusfreie Amplikons präpariert werden. Wird ein replikationsinkompetentes Virus als Helfervirus eingesetzt, wird dieses auch zu einem gewissen Anteil verpackt und man erhält ein Gemisch aus Amplikons und Helferviren. In transduzierten Zellen exprimieren diese Helferviren in geringen Mengen virale Gene, deren Produkte zytotoxische Aktivitäten haben und zu einer antiviralen Immunantwort führen (Wood, M.J. *et al.*, 1994) oder die Expression des Transgens beeinflussen können (Lowenstein, P.R. *et al.*, 1994). Bei einem Vergleich, bei dem helfervirusfreie oder -verunreinigte Amplikonpräparationen in das Zentralnervensystem von Mäusen injiziert wurden, konnte festgestellt werden, daß die helfervirusfreien Amplikons eine sehr viel geringere angeborene Immunantwort auslösten (Olschowka, J.A. *et al.*, 2003). Die neueste Entwicklung, um Verunreinigungen mit Helferviren zu vermeiden, ist die Verwendung des Cre-loxP-Systems, bei dem das Verpackungssignal des rekombinanten Helfervirus in einer transduzierten Zelllinie durch ortsspezifische Rekombination entfernt wird (Zaupa, C. *et al.*, 2003). Mit dieser Methode generierte Amplikonpräparationen enthalten weniger als 0,5% Helferviren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Amplikonpräparationen wurden im Labor von A. L. Epstein (Universität Lyon 1, Frankreich) mithilfe dieser Methode bzw. mit konventionellen, replikationsinkompetenten Helferviren hergestellt. Helfervirusfreie Amplikons exprimieren nur das gewünschte Transgen und keine viralen Gene, so daß sie keine negativen, immunmodulatorischen Effekte aufweisen und als genauso sicher wie DNA-Vakzine betrachtet werden können. Immunreaktionen können in diesem Fall nur gegen das durch das Transgen kodierte Protein und gegen die Hüllproteine auftreten. Dies erklärt auch, warum helfervirusfreie Amplikons DCs infizieren können, ohne deren Reifung oder immunstimulatorischen Funktionen zu hemmen (Willis, R.A. *et al.*, 2001).

Amplikonvektoren wurden bisher vorwiegend für genterapeutische Studien oder als Tumorstoffimpfung verwendet (Fraefel, C. *et al.*, 1996; Tolba, K.A. *et al.*, 2002a; Tolba, K.A. *et al.*, 2001; Tolba, K.A. *et al.*, 2002b; Willis, R.A. *et al.*, 2001). In einer Impfstoffstudie induzierte die Expression des *env*-Gens von HIV-1 nach Immunisierung mit Amplikons in Mäusen eine dauerhafte und spezifische zelluläre und humorale Immunantwort (Hocknell, P.K. *et al.*, 2002).

3.4 *Listeria monocytogenes*

Trotz eines existierenden Impfstoffs (Bacille Calmette-Guerin, BCG) und der möglichen Behandlung durch Antibiotika kommt es jährlich zu über zwei Millionen Todesfällen durch Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis*, dem Erreger der Tuberkulose (WHO: <http://www.who.int>). Der Impfstoff verhindert zwar die Manifestation der Krankheit bei Kindern, verliert aber seine Wirksamkeit nach einigen Jahren (Colditz, G.A. *et al.*, 1994). Hinzu kommt, daß BCG in Bevölkerungen der tropischen Regionen größtenteils nicht wirksam ist. Epidemiologische Schätzungen gehen davon aus, daß etwa ein Drittel der Weltbevölkerung latent mit *M. tuberculosis* infiziert ist und etwa 5-10% der Infizierten erkranken werden (WHO: <http://www.who.int>).

Als Modellorganismus für intrazelluläre Bakterien, und damit auch für *M. tuberculosis*, wird oftmals *Listeria monocytogenes* verwendet (Lane, F.C. und E.R. Unanue, 1972; Mackaness, G.B., 1969; North, R.J. und J.F. Deissler, 1975; Unanue, E.R., 1984; Unanue, E.R., 1997; Zinkernagel, R.M., 1974). Ähnlich wie *M. tuberculosis* hat auch *L. monocytogenes* Mechanismen entwickelt, dem Angriff des Immunsystems zumindest zeitweilig zu entkommen. Über kontaminierte Nahrung aufgenommen, kann es zu fatalen Krankheiten wie Enzephalitis, Meningitis oder zu Totgeburten führen (Schlech, W.F., 3rd *et al.*, 1983). Besonders schwangere Frauen, Kleinkinder und immunsupprimierte Menschen sind durch Listerien gefährdet. Dieses fakultativ intrazelluläre Bakterium dringt vermutlich primär über Enterozyten oder die M-Zellen der Peyerschen Plaques in den Wirt ein (MacDonald, T.T. und P.B. Carter, 1980; Racz, P. *et al.*, 1972). In der *Lamina propria* werden die Listerien von Makrophagen aufgenommen (Racz, P. *et al.*, 1972) und disseminieren dann in die Leber und die Milz. In der Leber der Maus werden etwa 90% der Bakterien durch dort ansässige Makrophagen, den sogenannten Kupffer Zellen, innerhalb von sechs Stunden eliminiert (Lepay, D.A. *et al.*, 1985). Die überlebenden Listerien infizieren benachbarte Hepatozyten und erzeugen damit eine systemische Infektion (Rosen, H. *et al.*, 1989).

Während *M. tuberculosis* in den Phagosomen von Makrophagen residiert, verläßt *L. monocytogenes* die Vakuolen sofort nach dem Eintritt in die Zelle (Bielecki, J. *et al.*, 1990; Smith, G.A. *et al.*, 1995). Im Zytoplasma einer Zelle angekommen, vermehrt sich das Bakterium schnell und benutzt die zelleigenen Aktinfilamente als Transportmittel, um in vakuolären Fortsätzen von den Nachbarzellen aufgenommen zu werden (Kocks, C. *et al.*, 1992; Smith, G.A. *et al.*, 1996). Diese Vakuolen werden wiederum lysiert, und ein neuer

Replikationszyklus kann beginnen. Durch die Lyse der Vakuolen entkommt das Bakterium den bakteriziden Effekten der Phagolysosomen, und der direkte Übergang von Zelle zu Zelle schützt es vor Antikörpern und Komplement. Besonders der Kontakt zu Makrophagen während einer Infektion ist von besonderer Bedeutung für die Pathogenese. Die frühe Kontrolle einer Primärinfektion mit *L. monocytogenes* hängt ausschließlich vom angeborenen Immunsystem ab. Die Zellen und Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems halten die Infektion zwar unter Kontrolle, können sie aber nicht beseitigen. Nach einigen Tagen hat sich die adaptive Immunantwort entwickelt. CD4-T-Zellen und B-Zellen spielen bei der Beseitigung einer Primärinfektion mit *L. monocytogenes* nur eine untergeordnete Rolle (Shedlock, D.J. *et al.*, 2003; Shen, H. *et al.*, 2003). Diese Aufgabe und die protektive Immunität gegen eine Reinfektion wird hauptsächlich von CD8-positiven CTL übernommen (Ladel, C.H. *et al.*, 1994; Mittrucker, H.W. *et al.*, 2000; North, R.J., 1973; Shen, H. *et al.*, 1998a). B-Zellen, Antikörper und CD4-T-Zellhilfe sind jedoch nötig, um ein optimales Level an CD8-Gedächtniszellen zu generieren (Shedlock, D.J. *et al.*, 2003; Shen, H. *et al.*, 2003). Die auf MHC-Molekülen präsentierten Peptide stammen von sezernierten Proteinen (z.B. Listeriolysin O, LLO und p60), die benötigt werden, damit *L. monocytogenes* die Vakuolen verlassen (Geginat, G. *et al.*, 2001; Harty, J.T. und M.J. Bevan, 1992; Safley, S.A. *et al.*, 1991; Xiong, H. *et al.*, 1998) und von benachbarten Zellen aufgenommen werden kann (Kuhn, M. und W. Goebel, 1989; Wuenscher, M.D. *et al.*, 1993). Die Stimulierung von TLRs auf APCs und die daraus resultierende Produktion von IL-12 ist dafür verantwortlich, daß es, wie bei *M. tuberculosis*, zu einer T_H1-gerichteten Immunantwort kommt.

Da es sich bei *L. monocytogenes* um ein sehr gut untersuchtes intrazelluläres Bakterium handelt, und die von ihm induzierten Immunantworten ebenfalls gut verstanden sind (Übersichtsartikel: Ireton, K. und P. Cossart, 1997; Shen, H. *et al.*, 1998b), wurde dieses Pathogen auch in der vorliegenden Arbeit als Modellorganismus für intrazelluläre Erreger verwendet. Shen *et al.* haben zudem ein genetisches System entwickelt, durch das rekombinante *L. monocytogenes* (rLM) hergestellt werden können, die ein fremdes Antigen stabil exprimieren (Shen, H. *et al.*, 1995). Da die Analyse der CD8-T-Zellantwort in C57BL/6-Mäusen (H-2K^b, D^b) durchgeführt werden mußte, in denen bisher keine Listeria-eigenen Epitope bekannt sind (nur H2-M3), wurden in der vorliegenden Arbeit rLM verwendet, welche Ovalbumin exprimieren. Diese rekombinanten Bakterien wurden bereits in mehreren Studien verwendet (Dudani, R. *et al.*, 2002; Pope, C. *et al.*, 2001; Smith, D.K. *et al.*, 2002).

3.5 Zielsetzung

Im Gegensatz zu den empirisch entwickelten Impfstoffen, die heutzutage erfolgreich eingesetzt werden, ist es für das rationale Impfstoffdesign wichtig, die Wechselwirkungen zwischen Wirt und Pathogen zu kennen und zu wissen, durch welche Immunantworten es möglich ist, eine Infektion zu vermeiden oder sie in ihrem Anfangsstadium zu beseitigen. Sind diese Voraussetzungen gegeben, ist es für eine erfolgreiche Impfstoffentwicklung entscheidend, die durch eine Immunisierung induzierte Immunantwort zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher zunächst die humorale und zelluläre Immunantwort untersucht werden, die durch Immunisierung mit verschiedenen genetischen Impfstoffvektoren induziert wird. Die Arbeit wurde auf die Verwendung genetischer Vakzine limitiert, da diese besonders geeignet sind, um neben einer humoralen auch eine starke CTL-Antwort zu induzieren. Diese Antwort ist besonders zur Bekämpfung zahlreicher intrazellulärer Erreger essentiell, für die es bisher noch keine Impfstoffe gibt. Im zweiten Teil sollte daher das Potential der Impfstoffvektoren untersucht werden, Mäuse vor Infektionen mit intrazellulären Bakterien zu schützen.

In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, daß die zelluläre Form des Antigens nach DNA-Immunisierung das Ausmaß und den Typ der Immunantwort beeinflusst (Boyle, J.S. *et al.*, 1997a; Drew, D.R. *et al.*, 2000; Torres, C.A. *et al.*, 1999). Diese Studien beschränkten sich allerdings weitestgehend auf die Untersuchung der Antikörperantwort. Insofern sollte im Rahmen dieser Arbeit der Effekt der Antigenlokalisierung erstmals auf die gesamte adaptive Immunantwort, d.h. humorale, T-Helferzell- und CTL-Antwort, untersucht werden. Da zudem mehrfach nachgewiesen wurde, daß die DNA-Immunisierung per *Gene Gun* effektiver als die intramuskuläre Injektion ist (Boyle, J.S. *et al.*, 1997b; Haynes, J.R. *et al.*, 1996; Torres, C.A. *et al.*, 1999; Yoshida, A. *et al.*, 2000), sollten diese beiden Methoden miteinander verglichen werden. Da OVA-spezifische TCR-transgene Mausstämme existieren, sollten Plasmide konstruiert werden, die für eine sezernierte oder eine membranständige Form dieses Modellantigens kodieren. Durch die Verwendung des ubiquitär aktiven CMV-Promotors und des DC-spezifischen CD11c-Promotors sollte zudem der Einfluß einer zellspezifischen Antigenexpression untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten neu entwickelte auf HSV-1 basierende Impfstoffvektoren getestet werden. In Abhängigkeit der Versuche aus dem ersten Teil, sollte eine Expressionskassette ausgewählt werden, um rekombinante, replikationsdefekte HSV-1-Vektoren bzw. HSV-1-Amplikons zu konstruieren. Zunächst sollte der Frage nachgegangen

werden, ob sich diese Vektoren für genetische Immunisierungen eignen. Hierzu sollten wiederum die humorale und zelluläre OVA-spezifische Immunantwort untersucht werden. Anschließend sollte überprüft werden, ob es mit diesen Modellimpfstoffen möglich ist, Mäuse vor einer Infektion mit rekombinanten intrazellulären Bakterien zu schützen. Da bisher keine eindeutigen Daten darüber vorliegen, ob eine bestehende antivirale Immunität den Einsatz viraler Impfstoffvektoren limitiert, sollte weiterhin diese Problematik für die verwendeten HSV-1-Vektoren untersucht werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle Lösungen, Medien und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. Die Herkunft speziell benötigter Reagenzien ist in der entsprechenden Methodenbeschreibung angegeben.

4.1.2 Geräte

Zentrifuge (Rotixa RP, Hettich, Tuttlingen), Wasserbad (Grant Instruments Ltd., Barrington Cambridge, England), Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg), Spannungsquelle (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), Chemikalienwaage (Kern, Albstadt), Feinwaage (Adventurer, Ohaus Corp., Pine Brooks, NJ, USA), Magnetrührer (Ika Labortechnik, Staufen), Pipetten (Gilson, Middleton, WI, USA), Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Baar, Schweiz), Vortex-Genie2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA).
Alle anderen verwendeten Geräte sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen erwähnt.

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einmal Injektionskanülen 26 G x 1/2“	Terumo Medical Corporation, Tokyo, Japan
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Plastik-Petrischalen	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen 5 ml	Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Sterilfilter 0,22 µm Millex [®] -GP	Millipore, Bedford, MA, USA

4.1.4 Peptide, Proteine und Oligonukleotide

Hühner-Ovalbumin (*albumin, chicken egg, Grade V*) wurde von der Firma Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) wurde von der Firma Neosystems (Straßburg, Frankreich) synthetisiert.

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) hergestellt:

5'-RIP-OVA: 5'-CAA GCA CAT CGC AAC CA-3'

3'-RIP-OVA: 5'-GCA ATT GCC TTG TCA GCA T-3'.

4.1.5 Antikörper

Tabelle 4.1: Verwendete Antikörper für Durchflußzytometrie und ELISA

Spezifität (Anti-Maus-)	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
CD4	APC	L3T4	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
	PE		
	PerCP		
	Biotin		
CD8	APC	Ly-2	Caltag (San Francisco, CA, USA)
	PE		BD Pharmingen
	PerCP		
CD44	PE	IM7.8.1	Caltag
CD62L	FITC	Mel14	BD Pharmingen
DO11.10	APC	KJ1-26	Caltag
	FITC		
V α 2-TCR	PE	B20.1	BD Pharmingen
V β 5.1/5.2-TCR	FITC	MR9-4	BD Pharmingen
IgM	HRP	polyklonal	Serotec, Oxford, England
IgG	HRP	polyklonal	Serotec
IgG1 (γ 1)	HRP	polyklonal	Southern Biotech Associates, Inc., Birmingham, AL, USA
IgG2a (γ 2a)	HRP	polyklonal	

APC-konjugiertes Streptavidin wurde von der Firma Caltag (San Francisco, CA, USA) bezogen. Das Tetramer H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄-m β 2m-SA-PE wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von D.H. Busch (TU München) hergestellt und zur Verfügung gestellt.

4.1.6 Plasmide

Ein *Bam*HI/*Xho*I-geschnittenes Fragment des Hasen- β -Globingens wurde in einen mit denselben Enzymen geschnittenen pcDNA3.1-Vektor (Invitrogen, Groningen, Die Niederlande) kloniert, um das Plasmid pcDNA3.1- β -Globin zu erhalten. Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1 enthält den *immediate/early*-Promotor und *enhancer* des humanen Zytomegalievirus (*human cytomegalovirus*, hCMV). Das Fragment des Hasen- β -Globingens enthält ein Intron und eine Polyadenylierungsstelle, die die posttranskriptionelle Modifikation des Transgens und damit seine Expression verbessern (Kouskoff, V. *et al.*, 1993).

Um das Plasmid CMV-OVA zu kreieren, wurde die komplette cDNA des Hühnerei-Albumins (Ovalbumin, OVA) mit *Eco*RI aus dem Plasmid pAc-Neo-OVA (freundlicherweise von F. Carbone (WEHI, Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellt) herausgeschnitten und in die *Eco*RI-Schnittstelle von pcDNA3- β -Globin kloniert. CMV-mOVA wurde konstruiert, indem das *Eco*RI-geschnittene Fragment TfR-OVA aus dem Plasmid pBlueRIP/TfR-OVA (freundlicherweise von F. Carbone (WEHI, Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellt) in die *Eco*RI-Schnittstelle von pcDNA3- β -Globin kloniert wurde. TfR-OVA kodiert die ersten 118 Aminosäuren des humanen Transferrinrezeptors fusioniert mit den Aminosäuren 139-386 von Ovalbumin, wodurch eine membrangebundene OVA-Form entsteht.

CD11c-OVA und CD11c-mOVA wurden kreiert, indem die jeweiligen mit *Eco*RI-geschnittenen Fragmente, OVA bzw. TfR-OVA, in die *Eco*RI-Schnittstelle des Plasmids pBS-CD11c- β -Globin (Brocker, T., 1997) kloniert wurden (Abb. 4.1).

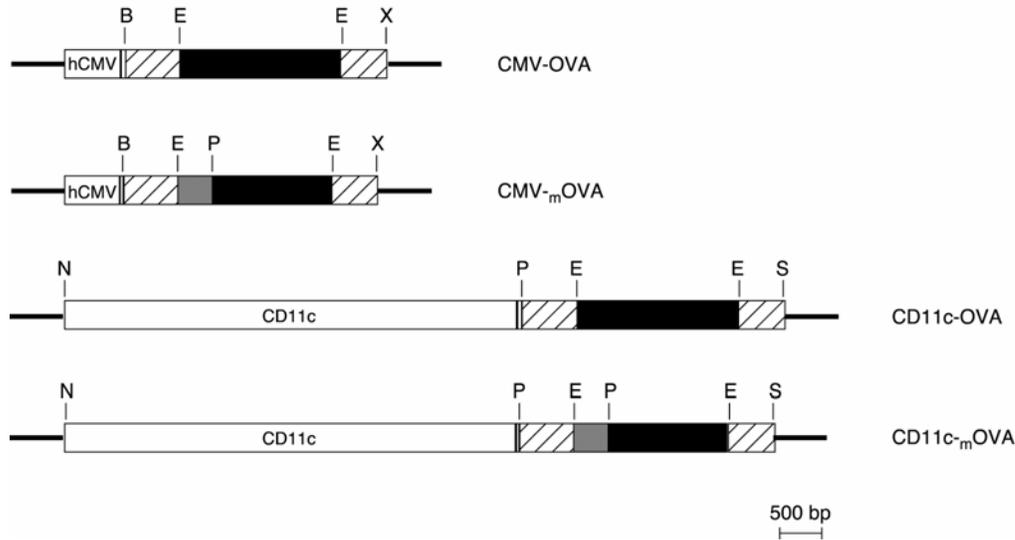


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der OVA-Konstrukte. Die cDNAs für sezerniertes (OVA) und membranständiges (_mOVA) Hühner-Ovalbumin (schwarze Boxen) wurden jeweils in die *EcoRI*-Schnittstelle des Hasen-β-Globin-Fragments (schraffierte Box) kloniert. Das membranständige OVA-Fusionsprotein besteht aus den ersten 118 Aminosäuren des humanen Transferrinrezeptors (TfR, graue Box) und den Aminosäuren 139-386 von Hühner-Ovalbumin (schwarze Box). Beide Transgenversionen wurden jeweils unter die Kontrolle des humanen CMV-Promotors (weiße Box) bzw. unter die Kontrolle des murinen CD11c-Promotors (weiße Box) kloniert (B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; N, *Not*I; P, *Pst*I; S, *Sal*I und X, *Xho*I).

4.1.7 Virale Vektoren

Alle rekombinanten Virusvektoren wurden unter S2-Bedingungen produziert.

Die replikationsdefekten, rekombinanten HSV-1-Vektoren HSV-OVA und HSV-GFP wurden im Labor von P. Marconi (Universität Ferrara, Italien) konstruiert und hergestellt. Beide Konstrukte basieren auf dem Vektor T0ZGFP (Kriskey, D.M. *et al.*, 1997). In diesem Vektor wurden die essentiellen *immediate early*-Gene ICP4, ICP27 und das Gen ICP22 deletiert. Die Expressionskassette hCMV-β-Globin-OVA wurde in den UL41-Lokus inseriert.

Die HSV-1-Amplikons AMP-OVA und _{hf}AMP-OVA wurden im Labor von A. L. Epstein (Universität Lyon 1, Frankreich) konstruiert und hergestellt. Bei _{hf}AMP-OVA handelt es sich um eine helfervirusfreie Präparation. Die Präparation erfolgte mit dem Cre-loxP-basierten Helfervirusystem (HSV-1 LaLΔJ) (Zaupa, C. *et al.*, 2003).

Die rekombinanten Vacciniaviren MVA-OVA wurden freundlicherweise von G. Sutter (GSF, Neuherberg) zur Verfügung gestellt.

4.1.8 Mausstämme

Alle Mäuse wurden in den Tierställen des Instituts für Immunologie in München gehalten.

BALB/c

Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2K^d.

C57BL/6

Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2K^b.

DO11.10

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zellrezeptor, der das Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ im Kontext von MHC-Klasse II I-A^d erkennt (Kappler, J.W. *et al.*, 1981). Der TZR kann spezifisch mit dem mAb anti-Maus DO11.10 TZR nachgewiesen werden (Abb. 4.2a).

OT-1

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zellrezeptor, der das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ im Kontext von MHC-Klasse I H2-K^b erkennt (Hogquist, K.A. *et al.*, 1994). Der TZR kann spezifisch mit den mAb anti-Maus V α 2 und V β 5.1, 5.2 TZR nachgewiesen werden (Abb. 4.2b).

RIP-OVA₁₀

Diese Mäuse exprimieren Ovalbumin als Autoantigen im Pankreas, in den Nieren und im Testis unter der Kontrolle des Ratten Insulinpromotors (*rat insulin promoter*, RIP) (Blanas, E. *et al.*, 1996). Immunisierung mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ führt in Tieren, in die zuvor OT-1-Zellen adoptiv transferiert wurden, zur Zerstörung der β -Inselzellen des Pankreas und damit zu Diabetes. Die diabetesbedingte Erhöhung der Glukosekonzentration im Urin kann mit Glukoseteststreifen (Diabur 5000, Roche Diagnostic, Rotkreuz, Schweiz) gemessen werden. Um zu testen, ob die Mäuse das Transgen enthalten, kann eine PCR mit genomischer DNA und den Primern 5'RIP-OVA und 3'RIP-OVA durchgeführt werden.

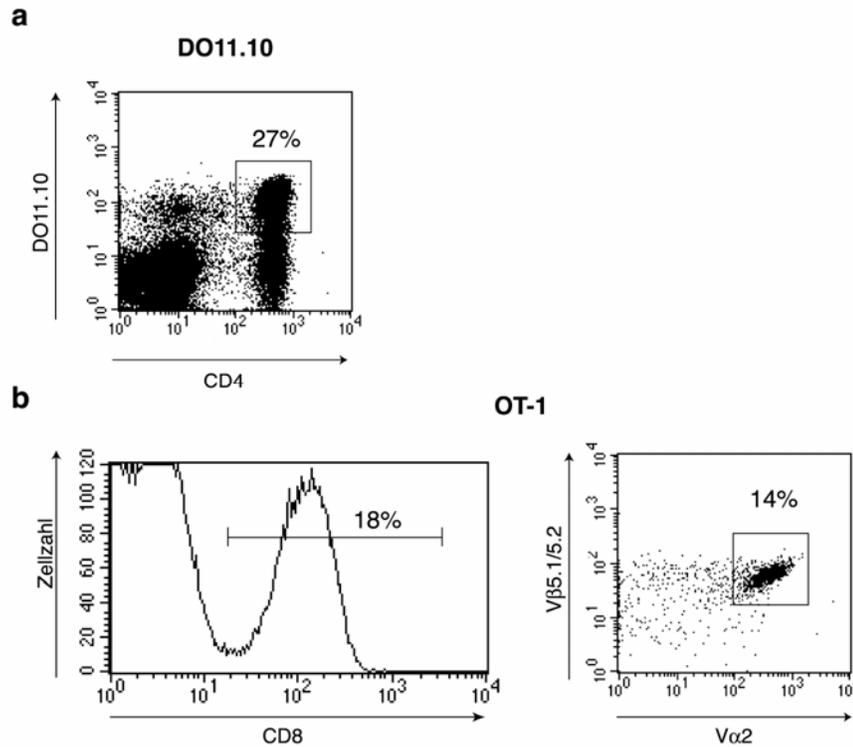


Abb. 4.2: Beispiele der zur Quantifizierung von transgenen T-Zellen durchgeführten FACS-Analyse. Suspensionen aus Milz- oder Lymphknotenzellen wurden mit spezifischen Antikörpern angefärbt und per Durchflußzytometrie analysiert. a) DO11.10-CD4-T-Zellen wurden durch die mAb DO11.10 und CD4 identifiziert. b) OT-1-T-Zellen wurden durch die mAb CD8, Vα2 und Vβ5.1/5.2 identifiziert. Angegeben ist jeweils der Prozentsatz transgener T-Zellen von allen lebenden Lymphozyten.

4.1.9 Pufferlösungen und Medien

ACK-Puffer

8,29 g NH₄Cl
 1 g KHCO₃
 37,2 mg Na₂EDTA
 H₂O ad 1 l
 pH 7,2-7,4 mit 1 N HCl einstellen und durch
 0,2 μm Filter sterilfiltrieren

PBS

150 mM NaCl
 10 mM Na₂HPO₄
 2 mM KH₂PO₄
 pH 7,4 mit 5 N NaOH einstellen

PBSN

0,05% NaN₃ (w/v)
 PBS

FACS-Puffer	0,01% NaN ₃ (v/v) 2% FBS (v/v) PBS
RFI	15% Glyzerin (v/v) 100 mM KCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM C ₂ H ₃ KO ₂ 10 mM CaCl ₂ pH 5,8 mit 0,2 mM Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern
RFII	15% Glyzerin 10 mM MOPS 10 mM KCl 75 mM CaCl ₂ pH 6,8 mit 1 N NaOH einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern
50× TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml 100% Essigsäure (Eisessig) 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Auftragspuffer BSU	21 g Harnstoff 25 g Saccharose 0,1 M EDTA 1 Spatelspitze Bromphenolblau H ₂ O ad 50 ml
Anästhetikum	0,25 ml 2% Rompun [®] (BayerVital, Leverkusen) 0,5 ml 100 mg/ml Ketavet [®] (Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen) PBS ad 5 ml
T-Zellmedium	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco, Gaithersberg, MD, USA) 10% FBS (inaktiviert, v/v) 500 mM β-Mercaptoethanol 1% Penizillin/Streptavidin (v/v)
<u>ELISA-Puffer</u>	
10× Waschpuffer	1010 g NaCl 10 g KCl 10 g KH ₂ PO ₄ 57,5 g Na ₂ HPO ₄ H ₂ O ad 5 l

1× Waschpuffer	1 l 10×Waschpuffer 5 ml Tween 20 H ₂ O ad 10 l
Blockierungslösung	0,05% NaN ₃ (w/v) 0,5% Milchpulver (w/v, Applichem) PBS
Antikörperlösung	0,05% Tween20 (v/v) 0,5% Milchpulver (w/v)
Kaliumzitatpuffer	42 g C ₆ H ₈ O ₇ *H ₂ O 950 ml H ₂ O pH 3,95 mit KOH einstellen 275 µl 30%ige H ₂ O ₂ H ₂ O ad 1 l bei 4°C im Dunkeln lagern
TMB-Lösung	240 mg TMB (3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidin) 5 ml C ₃ H ₆ O 45 ml CH ₃ OH bei RT im Dunkeln lagern
Substratlösung	5% TMB-Lösung (v/v) Kaliumzitatpuffer

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook, J.F., E.F. und Maniatis, T., 1989) diente der Auftrennung, Isolierung und Identifizierung von DNA-Fragmenten. In Abhängigkeit der erwarteten Größe der Fragmente wurden Horizontalgele verwendet, die 0,7% bis 2% [w/v] Agarose in TAE-Puffer enthielten. Der flüssigen Agaroselösung wurden zur späteren Analyse der DNA-Banden mit UV-Licht (312 nm, Intas, Göttingen) 7 µl pro 150 ml Gelvolumen einer 0,1%igen [w/v] Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/5 ihres Volumens mit Auftagspuffer vermischt. Als Längenstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter (Gibco BRL, Gaithersberg, MD, USA) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V in einer Elektrophoresekammer (Werkstatt, Institut für Immunologie, München) mit 1×TAE als Laufpuffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit einem Geldokumentationssystem (Intas, Göttingen) fotografiert.

4.2.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden zunächst unter UV-Licht ausgeschnitten und in sterile Reaktionsgefäße überführt. Die Isolierung des gewünschten Fragments aus dem Agarosestück wurde mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde mit H₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

4.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung kleiner Mengen an DNA (bis 20 µg) aus Bakterien wurden QIAprep[®] Spin Miniprep Kits (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit QIAGEN® (Qiagen GmbH, Hilden) Plasmid Maxi oder Mega Kits gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die Ausbeuten bei Verwendung des Maxi Kits lagen bei ca. 300-500 µg DNA aus 100 ml Bakterienkultur und 1,5-2,5 mg DNA aus 500 ml bei Verwendung des Mega Kits. Die isolierte DNA wurde in H₂O gelöst und bei –20°C gelagert.

4.2.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch (UV-Spektrophotometer Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H₂O in Quarzküvetten durchgeführt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD₂₆₀-Einheit 50 µg dsDNA pro ml. Die Reinheit der DNA ergab sich aus dem Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm. DNA-Lösungen mit einem geringen Proteinanteil zeigen dabei Quotienten von 1,8-2,0.

4.2.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung von DNA-Proben über Restriktionsfragmente oder deren Vorbereitung für weitere Klonierungsschritte wurde die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen entsprechend den Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) durchgeführt. Anschließend wurden die Fragmente durch Agarosegelelektrophorese analysiert oder mittels QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aufgereinigt.

4.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Das verwendete Enzym für die Ligasereaktion ist die T4 DNA-Ligase, die die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer 3'Hydroxyl- und einer 5'Phosphorylgruppe von Nucleinsäuren katalysiert. Der notwendige Kofaktor für diese Reaktion ist bei dieser Ligase ATP. In der Regel wurden die zu ligierenden DNA-Fragmente enzymatisch so gespalten, daß sie überhängende, vollständig zueinander komplementäre Enden besaßen. Die Reaktion wurde in Ligasepuffer mit 400 U T4-Ligase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA),

100 ng gespaltenem Vektor und der 2-3 fachen Menge des zu inserierenden DNA-Fragments in einem Endvolumen von 20 μ l durchgeführt. Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und direkt zur Transformation kompetenter *Escherichia coli* Bakterien verwendet.

4.2.1.7 Bakterienkultur

Die Kultur von Bakterien fand in LB-Medium statt, dem als Selektionsmarker 100 μ g/ml Ampizillin zugesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Bakterienschüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz). Zur Kultur auf festem Medium wurden LB-Agarplatten ebenfalls mit 100 μ g/ml Ampicillin verwendet und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die dauerhafte Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde 1 ml einer Übernachtskultur mit 1 ml Glycerin sorgfältig vermischt und bei -80°C gelagert.

Es wurde der Stamm *Escherichia coli* DH5 α (Genotyp supE44, Δ lacU169 (Φ 80d lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 (Hanahan, D., 1983)) verwendet.

4.2.1.8 Herstellung chemokompetenter Bakterien

1 ml einer Übernachtskultur einer Einzelkolonie von *E. coli* DH5 α wurde in 100 ml LB-Medium verdünnt, mit einem Zusatz von 10 mM MgCl₂ bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Die Bakteriensuspension wurde bei 4000 g und 4°C 25 min zentrifugiert, in 40 ml eisgekühltem RFI-Medium resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 4 ml RFII-Medium resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und in Aliquots zu 100 μ l aufgeteilt. Die Aliquots wurden bei -80°C aufbewahrt.

4.2.1.9 Transformation chemokompetenter Bakterien

Für jede Transformation wurde ein Aliquot (100 μ l) chemokompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 10-20 μ l des Ligationsansatzes und kurzem Vermischen, wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde anschließend für 90

sec in einem Wasserbad einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und dann wieder für 2 min auf Eis gestellt. Zur Expression des Resistenzgens wurde 1 ml LB-Medium zugefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden Aliquots des Ansatzes auf LB-Agarplatten, welche das Antibiotikum Ampizillin enthielten, plattiert und bei 37°C inkubiert.

4.2.1.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (Mullis, K. *et al.*, 1986) wurden spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert, um das Transgen in RIP-OVA₁₀-Mäusen nachzuweisen. Durch die Verwendung zweier spezifisch bindender Oligonukleotid-Primer, die die zu amplifizierende Sequenz flankieren, lassen sich spezifische DNA-Bereiche enzymatisch vervielfältigen. Durch mehrere aufeinanderfolgende temperaturabhängige Denaturierungs-, Primeranlagerungs- und Polymerisationsschritte kommt es zu einer exponentiellen Zunahme des gewünschten Fragments, dessen Enden durch die Primer festgelegt sind. Die DNA-Polymerisation erfolgt durch eine hitzstabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Chien, A. *et al.*, 1976).

PCR-Reaktionsbedingungen

1-100 ng Plasmid-DNA
 1,25 µl Primer #1 (10 pmol/µl)
 1,25 µl Primer #2 (10 pmol/µl)
 1 µl MgCl₂ (50 mM)*
 2,5 µl 10x NH₄-Puffer*
 2 µl dNTP-Mix (10 mM)[#]
 0,25 µl Panscript DNA Polymerase (5 U/µl)*
 ad 20 µl H₂O_{bid}

* Pan Biotech GmbH, Aidenbach

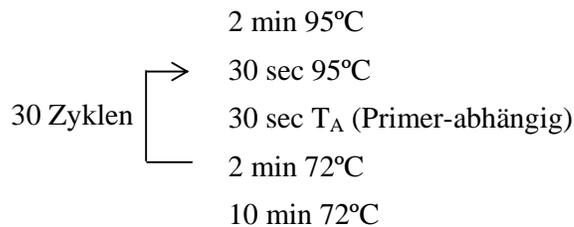
[#] Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA

Die Schmelztemperatur (T_M) (Wallace, R.B. *et al.*, 1979) und die Anlagerungstemperatur (T_A) wurden mittels folgender Formel berechnet:

$$T_M = [(G+C) \times 4^\circ\text{C}] + [(A+T) \times 2^\circ\text{C}]$$

$$T_A = T_M - 5^\circ\text{C}$$

Zur Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente im T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen) wurden in der Regel folgende Reaktionsbedingungen gewählt:



4.2.1.11 Isolierung genomischer DNA aus Gewebebiopsien

Die Gewebeproben, hier Schwanzspitzen, werden mit einem sterilen Skalpell in 1-2 mm große Stücke geschnitten. Das Anfangsstück wird dabei verworfen, um Kontaminationen mit Blutspuren anderer Mäuse zu vermeiden. Die Gewebeprobe wird zusammen mit 100 μl sterilem H_2O in ein Reaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wird bei 95°C für 10 min inkubiert, um endogene Peptidasen zu zerstören und anschließend kurz zentrifugiert. Dann werden 2 μl Proteinase K (2mg/ml) zugefügt und mit dem Ansatz vermischt. Während einer etwa zwölfstündigen Inkubation bei 54°C wird das Schwanzstück verdaut. Bevor die freigesetzte genomische DNA verwendet werden kann, muß die Proteinase K durch eine zehnmünütige Inkubation bei 95°C inaktiviert werden. Anschließend kann ein Aliquot der DNA direkt in einem PCR-Ansatz verwendet werden.

4.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden

4.2.2.1 Lymphozytenanreicherung und Serumgewinnung aus peripheren Blut

Für die Blutabnahme wurde die Maus unter einer Infrarotlampe erwärmt. Dies führt zur Weitung der Blutgefäße (Vasodilatation) und somit zur Förderung der Durchblutung. Durch einen Schnitt in die untere Schwanzvene wurden der Maus einige Tropfen (ca. 100 bis 200 µl) Blut entnommen und sofort mit ca. 50 µl Heparin-Natrium (25000 I.E./5 ml, Ratiopharm, Ulm) vermischt, um die Blutgerinnung zu verhindern. Nach Zugabe von 2 ml FACS-Puffer (RT) wurde mit 1 ml Lymphozytenseparationsmedium (PAA Laboratories, Linz, Österreich) (RT) unterschichtet und 30 min bei 1500 UpM und 20°C zentrifugiert. Während der Zentrifugation passieren Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und tote Zellen das Separationsmedium, wohingegen Lymphozyten aufgrund ihrer geringen Dichte auf dem Medium schwimmen. Dieser sich in der Interphase befindende Lymphozytenring wurde mit einer Pasteurpipette in ein neues 5 ml Reaktionsgefäß mit 3 ml kaltem FACS-Puffer überführt und 5 min bei 1200 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bis auf ca. 100 µl abgesaugt.

Zur Serumgewinnung wurde das Blut nicht mit Heparin vermischt, sondern 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 3000 UpM in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Gefäß transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

4.2.2.2 Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension

Zur Organentnahme wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation getötet, äußerlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert.

Die Lage der Lymphknoten kann Abb. 4.3 entnommen werden. Sie wurden mit feinen Pinzetten entnommen und in FACS-Puffer auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Milz befindet sich in der linken mittleren Bauchhälfte und ist ein längliches, dunkelrotes Organ. Sie kann mit einer feinen Schere herausgelöst und in FACS-Puffer auf Eis gelagert werden. Bei allen Organentnahmen sollte darauf geachtet werden, das Fett zu entfernen, da dies bei der späteren Verarbeitung zu viele Zellen bindet.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Organe in einer Petrischale (\varnothing 5cm) mit etwas FACS-Puffer zwischen zwei Gazestückchen (Franz Eckert GmbH, Waldkirch, Porengröße 100 μ m) mit dem Stempel einer Injektionspritze zerrieben. Die Zellsuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen je nach weiterer Verwendung im gewünschten Puffer oder Medium suspendiert. Die aus der Milz gewonnene Zellsuspension wurde anschließend einer Erythrozytenlyse unterzogen.

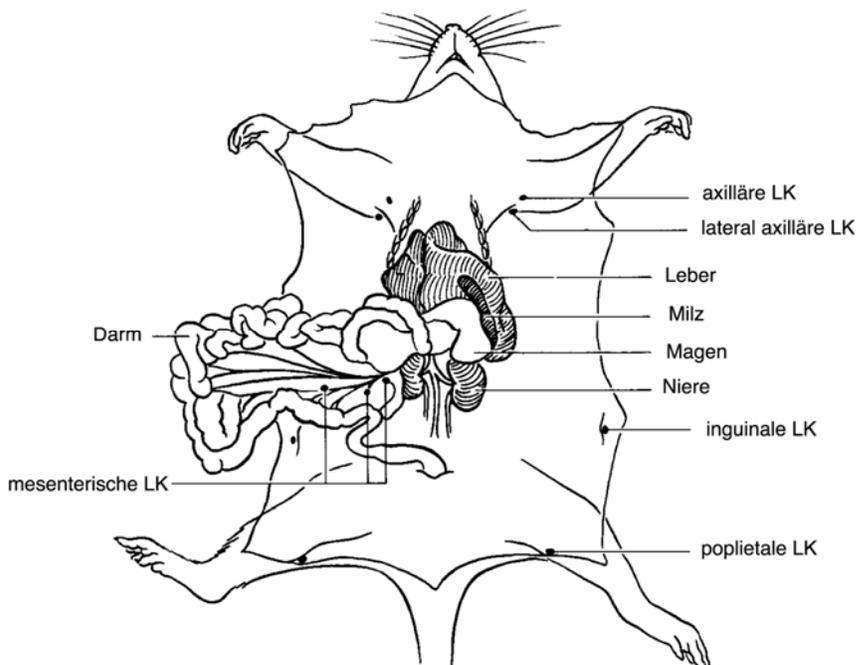


Abb. 4.3: Lage der wichtigsten Organe der Maus (Quelle: (Reeves, J.P.R., P. A., 2001), verändert).

4.2.2.3 Erythrozytenlyse

Um die Erythrozyten aus einer Milzzellsuspension zu entfernen, wurde diese in 4 ml ACK Puffer suspendiert und 5 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Da Erythrozyten eine Natrium-Kalium-Pumpe fehlt, können diese die einströmenden Ionen nicht mehr aus der Zelle befördern. Um den osmotischen Druck auszugleichen, strömt Wasser in die Zellen und bringt diese dadurch zum Platzen. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit 10 ml FACS Puffer verdünnt und bei 1200 UpM

und 4°C für 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in Puffer oder Medium resuspendiert und auf Eis gelagert.

4.2.2.4 Färbung von Lymphozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern

Zu 50-100 µl Zellsuspension wurde das gleiche Volumen in kaltem FACS Puffer entsprechend vorverdünnter Antikörper gegeben, gut gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Falls notwendig wurde nun eine Färbung mit einem sekundären Antikörper oder Reagens wie z.B. Streptavidin durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift verblieben ca. 200 µl in dem Reaktionsgefäß.

4.2.2.5 Durchflußzytometrie (FACS Analyse)

Mit einem FACS Gerät (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) kann die relative Größe, Granularität oder interne Komplexität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Zellen werden dazu in einem Flüssigkeitsstrom durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wobei beim einzelnen Passieren einer Zelle Licht gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward angle light scatter*, FSC) ist das Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) das Maß für die Granularität einer Zelle. Granulozyten und Makrophagen enthalten mehr Granula als Lymphozyten und weisen daher ein höheres SSC-Signal auf. Tote Zellen haben normalerweise mehr Granula als lebende Lymphozyten, sind aber deutlich kleiner. Die Fluorochrome, mit denen die Zellen gegebenenfalls markiert wurden, absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch sogenannte *Photomultiplier* in elektronische Signale konvertiert und gibt somit Auskunft über die Anzahl fluoreszierender Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität. Bei der Analyse der aufgenommenen Zellen kann die interessierende Zellpopulation durch Eingrenzen der entsprechenden Region genau betrachtet werden. Gängige Darstellungsweisen sind das Histogramm, bei dem nur eine Streugröße oder Fluoreszenz dargestellt wird, oder das Punktwolkendiagramm (*dot plot*), bei dem zwei Streugrößen bzw. Fluoreszenzen gegeneinander dargestellt werden.

Die Messungen erfolgten mit einem FACSCalibur™-Durchflußzytometer (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) mit zwei Lasern, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren (488 und 633 nm). Die Datenaufnahme und -analyse erfolgte mit CellQuest Software, Version 3.4 (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA).

4.2.2.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Zellzählgerätes Coulter Z2 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) bestimmt. Die Methode dieses Gerätes basiert auf der messbaren Veränderung des elektrischen Widerstandes, die von einer Zelle ausgelöst wird, die in einem Elektrolyt suspendiert ist und eine Kapillaröffnung zwischen zwei Elektroden passiert. Die Höhe des ausgelösten elektrischen Impuls ist dabei proportional zu dem Volumen der Zellen, wohingegen die Anzahl der Impulse die Zahl der aufgenommenen Zellen wiedergibt. Durch Zugabe von Zap-O-Globin (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) werden nur lebende Zellen gezählt.

4.2.2.7 Adoptiver Zelltransfer

Der adoptive Transfer von TZR-transgenen T-Zellen in syngene Mäuse erlaubt die Untersuchung von T-Zellantworten auf Immunisierungen mit dem entsprechenden Antigen (Übersichtsartikel: Pape, K.A. *et al.*, 1997).

Dazu wurden Einzelzellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten aus DO11.10- oder OT-1-Mäusen hergestellt. Die Erythrozyten in der Milzzellsuspension wurden lysiert. Um den prozentualen Anteil der transgenen T-Zellen zu bestimmen, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden $2,5 \times 10^6$ DO11.10- bzw. 5×10^6 OT-1-Zellen pro Maus intravenös transferiert. Direkt vor der Injektion wurden die Zellen durch ein Nylonnetz (Reichelt Chemie Technik, Porengröße 51 μm) filtriert, um eine Verklumpung zu vermeiden. Es wurden nur Zellen in syngene, gleichgeschlechtliche Mäuse transferiert.

4.2.2.8 Gene Gun-Immunisierung

Die *Gene Gun*-Immunisierung ist eine physikalische Methode der Zelltransformation, bei der mit DNA beladene Goldpartikel direkt in die Zielzellen geschossen werden. Die Technik wurde zunächst als eine Methode des Gentransfers in Pflanzen (Boynton, J.E. *et al.*, 1988; Bruce, W.B. *et al.*, 1989) beschrieben, und später wurde auch die Anwendung in experimentellen Säugetiermodellen (Williams, R.S. *et al.*, 1991; Yang, N.S. *et al.*, 1990) gezeigt.

Zur Immunisierung von Mäusen wurde das Helios *Gene Gun*-System verwendet (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Die Goldpartikel (\varnothing 1 μ m) wurden gemäß den Angaben des Herstellers mit DNA beschichtet. Dazu wurden jeweils 25 mg Goldpartikel mit 200 μ g DNA beladen. Die verwendete Polyvinyl-Pyrrolidon- (PVP-) Konzentration betrug 0,1 mg/ml. Die Mäuse wurden vor der Immunisierung zunächst narkotisiert (150 μ l Ketavet[®]/Rompun[®] intraperitoneal) und anschließend abdominal rasiert (ca. 4 cm², Braun EP80, Braun GmbH, Kronberg). Pro Immunisierung wurden zwei nichtüberlappende Schüsse mit einem Druck von 400 psi ausgeführt. Dies entspricht durchschnittlich einer Menge von ca. 8 μ g DNA pro Maus und Immunisierung.

4.2.2.9 Immunisierung mit Peptid in kompletten Freund'schen Adjuvans

Komplettes Freund'sches Adjuvans (*complete Freund's adjuvant*, CFA; Sigma, St. Louis, MO, USA) ist ein öliges Adjuvans, das im Tierexperiment als Zusatz zum Antigen dessen Immunisierungseffekt steigert. Es enthält abgetötete Mykobakterien oder deren Zellwandbestandteile (meist *Mycobacterium butyricum*).

Das Antigen wurde in PBS gelöst (2 mg/ml) und mit einem Volumen CFA gründlich vermischt, so daß sich eine konsistente Emulsion bildete. Pro Immunisierung wurden jeweils 100 μ l der Emulsion an drei Stellen am Rücken der Maus subkutan injiziert. Dies entspricht einer Menge von 300 μ g Antigen pro Maus und Immunisierung. Die Mäuse wurden vor der Injektion mit einem Inhalationsanästhetikum (Isofluran-Baxter, Baxter, Lessines, Belgien) betäubt.

4.2.2.10 Immunisierung mit rekombinanten Herpes Simplex Viren Typ 1 (rHSV-1)

Die zur Immunisierung verwendeten Viren wurden auf Eis aufgetaut und mit PBS bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Anschließend wurde die Suspension gut gemischt, für 5 sec in ein Ultraschall-Wasserbad (Ultrason E, Greiner, Frickenhausen) gestellt und bis zur Injektion auf Eis gelagert. Zur intravenösen, intraperitonealen und subkutanen Immunisierung wurden jeweils 200 µl injiziert. Zur intravenösen Injektion wurden die Mäuse zunächst unter einer Infrarotlampe erwärmt und die Viren anschließend in eine der beiden lateralen Schwanzvenen injiziert. Die subkutane Injektion wurde am Nacken der Maus durchgeführt. Zur intradermalen Immunisierung wurden jeweils 50 µl der Virussuspension an der Schwanzbasis injiziert. Bei der intranasalen Immunisierung wurden 20 µl mit einer 10µl-Pipette langsam auf beide Nasenlöcher verteilt und durch den Atem der Maus inhaliert.

4.2.2.11 *In vivo* Zytotoxizitätstest

Dieser Test erlaubt die Messung der zytotoxischen Effektorfunktion von CD8-T-Zellen *in vivo* (Coles, R.M. *et al.*, 2002). Dazu wurden Einzelzellsuspensionen von Milz und Lymphknoten präpariert und die Erythrozyten lysiert. Die Zellen wurden mit PBS/2% fötalem Rinderserum (*foetal bovine serum*, FBS) (v/v) gewaschen, in T-Zellmedium aufgenommen und in zwei Populationen aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit Peptid beladen, indem dem Zellkulturmedium das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (20 µg/ml) zugefügt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend mit einer hohen Konzentration Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidylester (CFSE, 1,7 µM) angefärbt (CFSE^{hoch} Zellen). Die andere Hälfte blieb unbeladen und wurde mit einer niedrigen Konzentration CFSE (0,2 µM) angefärbt (CFSE^{niedrig} Zellen). Die CFSE-Färbung wurde bei 37°C im Wasserbad durchgeführt und durch Zugabe eines Volumens FBS gestoppt. Um das FBS zu entfernen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Vor der Injektion wurden die Zellen beider Populationen im Verhältnis 1:1 vermischt, so daß jede Maus 10-30×10⁶ Zellen in 500 µl PBS bekam. Die Zellen wurden in syngene Mäuse injiziert, die einige Tage bis Wochen (je nach Experiment) zuvor gegen Ovalbumin immunisiert worden waren. Die Mäuse wurden nach 5-15 Stunden getötet, um ihre Milzen zu isolieren. Die Milzzellen wurden ohne weitere Färbung mittels Durchflußzytometrie analysiert, und jede

Population wurde durch ihre unterschiedliche CFSE-Fluoreszenzintensität detektiert. Um die spezifische Lyse zu berechnen, wurden folgende Formeln verwendet:

Verhältnis beider Populationen zueinander:

$$r = (\text{Prozentsatz CFSE}^{\text{niedrig}} / \text{Prozentsatz CFSE}^{\text{hoch}})$$

Prozentsatz der spezifischen Lyse (PSL):

$$\text{PSL} = [1 - (r \text{ von nicht immunisierter Maus} / r \text{ von immunisierter Maus}) \times 100]$$

4.2.2.12 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA)

Mit Hilfe einer enzymvermittelten Reaktion können mit einem ELISA (*Enzyme linked immuno sorbent assay*) die gegen ein bestimmtes Antigen gebildeten Antikörper detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden ELISAs zur Detektion von Serumantikörpern gegen OVA und HSV-1 durchgeführt. Dazu wurden Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden) entweder mit OVA (15 µg/ml) oder mit rHSV-1 (HSV-GFP, 2×10^5 I.E./ml) beschichtet. Es wurden jeweils 50 µl pro Kavität der Antigen/PBSN-Lösung in die Platten pipettiert, die anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Vor Gebrauch wurden die Platten fünfmal mit PBS gewaschen und dann mit 50 µl/Kavität Blockierungspuffer eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf Waschsritten mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe der zu testenden Seren (50 µl/Kavität), die entsprechend in Blockierungspuffer verdünnt waren. Nach zwei Stunden wurde wieder fünfmal gewaschen. Die enzymgekoppelten anti-Maus Antikörper wurden in Antikörperlösung verdünnt, in die Kavitäten verteilt (50 µl/Kavität) und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten wieder fünf Waschsritte und anschließend die Zugabe von 100 µl Substratlösung pro Napf. Die Färbereaktion wurde je nach Geschwindigkeit des Farbumschlags nach fünf bis 20 Minuten durch Zugabe von 50 µl H₂SO₄/Kavität abgestoppt. Die Färbung der einzelnen Ansätze wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers (Vmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) als optische Dichte (OD) bei einer dualen Wellenlänge von 450 nm und 690 nm gemessen. Die Waschsritte erfolgten mit einem automatischen Waschgerät (96 PW, SLT Labinstruments, Gröding, Österreich).

4.3 Statistik

Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte (Student'scher *t*-Test) wurden mit dem Programm Microsoft[®] Excel 2001 berechnet.

5 ERGEBNISSE

Immunisierungen mit verschiedenen Impfstoffen oder Methoden lösen unterschiedliche Immunantworten aus. Die induzierten Antworten unterscheiden sich u.a. in den gebildeten Antikörpertypen sowie in der Art und Stärke der T-Helferzell- und CTL-Antwort. Der Charakter einer Immunantwort wiederum ist entscheidend dafür, ob ein Organismus vor einem spezifischen pathogenen Organismen geschützt ist oder nicht. Daher ist es wichtig, die durch eine Immunisierung mit einem bestimmten Impfstoff induzierte Immunantwort zu charakterisieren.

5.1 Die Immunantwort auf DNA-Immunisierungen

Die einfachste Form der genetischen Immunisierung ist die Immunisierung mit bakterieller Plasmid-DNA. Zahlreiche Untersuchungen haben festgestellt, daß sich die Immunantworten nach einer DNA-Immunisierung in Abhängigkeit der gewählten Immunisierungsrouten und des kodierten Antigens unterscheiden (Boyle, J.S. *et al.*, 1997a; Drew, D.R. *et al.*, 2000; Feltquate, D.M. *et al.*, 1997; Torres, C.A. *et al.*, 1997; Torres, C.A. *et al.*, 1999). Bisher gibt es allerdings keine Studie, bei der der Einfluß verschiedener Antigenformen und Immunisierungsrouten sowohl auf die humorale Immunantwort als auch auf die CD4- und CD8-T-Zellantwort *in vivo* untersucht wurde. Zu diesem Zweck wurden vier OVA-kodierende Plasmide konstruiert (s. Abb. 4.1): 1) CMV-OVA kodiert die lösliche, sezernierte, 2) CMV_mOVA die membrangebundene OVA-Form jeweils unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven hCMV-Promotors; 3) CD11c-OVA und 4) CD11c_mOVA kodieren die jeweilige OVA-Form unter der Kontrolle des DC-spezifischen CD11c-Promotors. Nach i.m. und *Gene Gun*-Immunisierung mit diesen Plasmiden wurde die jeweils induzierte Antikörperantwort, sowie die CD4- und CD8-T-Zellantwort miteinander verglichen. Da die i.m. Impfung weder zu einer meßbaren humoralen noch zu einer zellulären Immunantwort in den verwendeten Systemen geführt hat, wird auf diese Daten im Folgenden nicht weiter eingegangen.

5.1.1 Einfluß der zellulären Lokalisierung des Antigens auf die Antikörperantwort

Um den Einfluß der zellulären Lokalisierung des Antigens auf die Bildung spezifischer Antikörper zu untersuchen, wurden Mäuse mit jeweils einem der vier beschriebenen Plasmide (CMV-OVA, CMV-_mOVA, CD11c-OVA und CD11c-_mOVA) immunisiert. Die Vakzinierung erfolgte mit der *Gene Gun* an den Tagen 0 und 14. Der OVA-spezifische Antikörpertiter im Serum der Mäuse wurde vor sowie 13 und 29 Tage nach der Immunisierung mittels ELISA bestimmt. In keiner Gruppe konnten signifikante Mengen OVA-spezifischer Antikörper der IgM-Klasse gemessen werden (Abb. 5.1a). Im Gegensatz dazu wurde in allen Mäusen die Bildung von IgG-Antikörpern induziert (Abb. 5.1b). Dabei zeigte sich, daß die Expression von sezerniertem Antigen zu höheren Titern führt als die Expression von membrangebundenem Antigen. In den CMV-OVA- und CD11c-OVA-immunisierten Mäusen konnte bereits nach 13 Tagen ein erhöhter Titer nachgewiesen werden, der nach der zweiten Immunisierung (Tag 14) noch weiter anstieg, wohingegen in _mOVA-immunisierten Tieren erst 15 Tage nach der zweiten Immunisierung (Tag 29) ein erhöhter Titer zu messen waren. Desweiteren induzierte jeweils das unter der Kontrolle des CMV-Promotors ubiquitär exprimierte Antigen höhere IgG-Titer als die ausschließlich in DCs exprimierte entsprechende Antigenform. Statistisch signifikant ist allerdings nur der Unterschied zwischen CD11c-OVA- und CD11c-_mOVA-immunisierten Mäusen (Student'scher *t*-Test $p < 0,05$). Um eine qualitative Aussage über die Antikörperantwort machen zu können, wurden die Titer der beiden Isotypen IgG1 und IgG2a bestimmt. Eine IgG1-Dominanz deutet auf eine T_H2-gerichtete Immunantwort hin, ein hoher IgG2a-Titer hingegen ist charakteristisch für eine T_H1-gerichtete Antwort. OVA-spezifische IgG2a-Antikörper über dem Hintergrundniveau (Tag 0) konnten in keiner Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 5.1c). Dagegen führte die DNA-Immunisierung in allen Tieren zur Bildung von IgG1-Antikörpern (Abb. 5.1d). Die relativen Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Kinetik und Höhe der IgG-Antwort wurden auch für die IgG1-Subklasse gezeigt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß antigenspezifische Antikörper schneller gebildet werden, wenn das Antigen nach einer *Gene Gun*-Immunisierung sezerniert wird (OVA), und daß diese Antigenform (innerhalb des Untersuchungszeitraums) zu höheren Titern führt als die membranständige Form (_mOVA). Unter dem CMV-Promotor exprimiertes Antigen führt zu einer tendenziell höheren Antikörperantwort als unter dem DC-spezifischen CD11c-Promotor exprimiertes Antigen. Die *Gene Gun*-Immunisierung führte in allen Tieren zu einer T_H2-gerichteten Antwort und damit zu einer IgG1-dominierten Antikörperantwort.

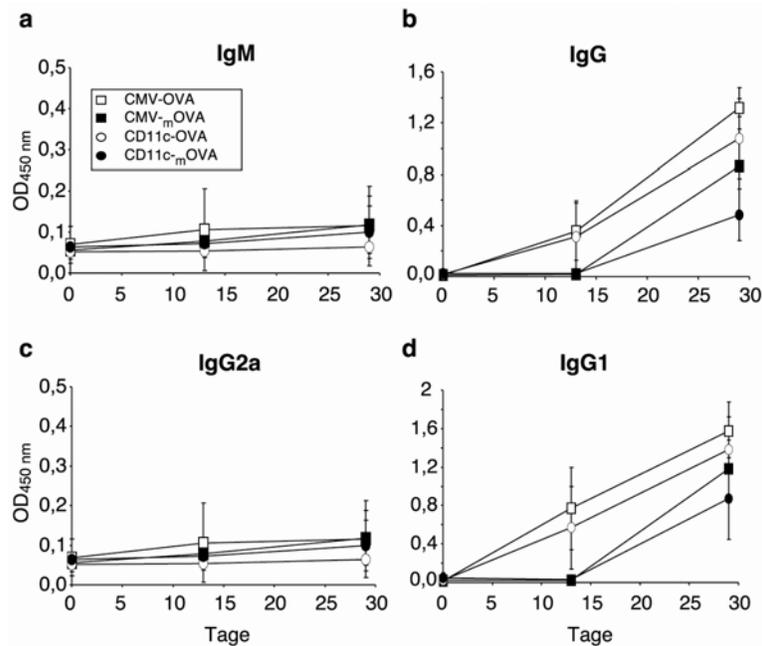


Abb. 5.1: OVA-spezifische Antikörperantwort in DNA-immunisierten Mäusen. BALB/c-Mäuse wurden mit CMV-OVA, CMV-mOVA, CD11c-OVA oder CD11c-mOVA an Tag 0 und 14 mit der *Gene Gun* immunisiert. Zuvor und an den angegebenen darauffolgenden Tagen wurde Serum gewonnen und in einer 1:150 Verdünnung mittels ELISA auf das Vorhandensein OVA-spezifischer Antikörper getestet. Als Sekundärantikörper wurden (a) anti-IgM, (b) anti-IgG, (c) anti-IgG1 oder (d) anti-IgG2a verwendet. Alle Serumproben wurden in Doppelsätzen getestet. Angegeben ist jeweils die durchschnittliche OD_{450nm} (\pm SD) (n=5 Mäuse/Gruppe).

5.1.2 Einfluß der zellulären Lokalisierung des Antigens auf die CD4-T-Zellantwort

Als nächstes, sollte auch die zelluläre Antwort *in vivo* untersucht werden. Da die Aktivierung naiver T-Zellen *in vivo* wegen ihrer geringen Vorläuferfrequenz nur mit *in vitro* Restimulationstests zu untersuchen ist, wurde ein adoptives Transfersystem mit TCR-transgenen T-Zellen verwendet (Übersichtsartikel: Pape, K.A. *et al.*, 1997). Um die CD4-Antwort zu untersuchen, wurden jeweils $2,5 \times 10^6$ DO11.10-Zellen in syngene BALB/c-Mäuse transferiert, die anschließend entweder mit CMV-OVA oder CD11c-OVA immunisiert wurden. DO11.10-T-Zellen sind transgen für einen α/β -TCR, der ein auf MHC-II I-A^d präsentierte Epitop von Ovalbumin (OVA₃₂₃₋₃₃₉) erkennt (Kappler, J.W. *et al.*, 1981) und mit dem monoklonalen Antikörper DO11.10 spezifisch nachgewiesen werden kann (Abb. 5.2a).

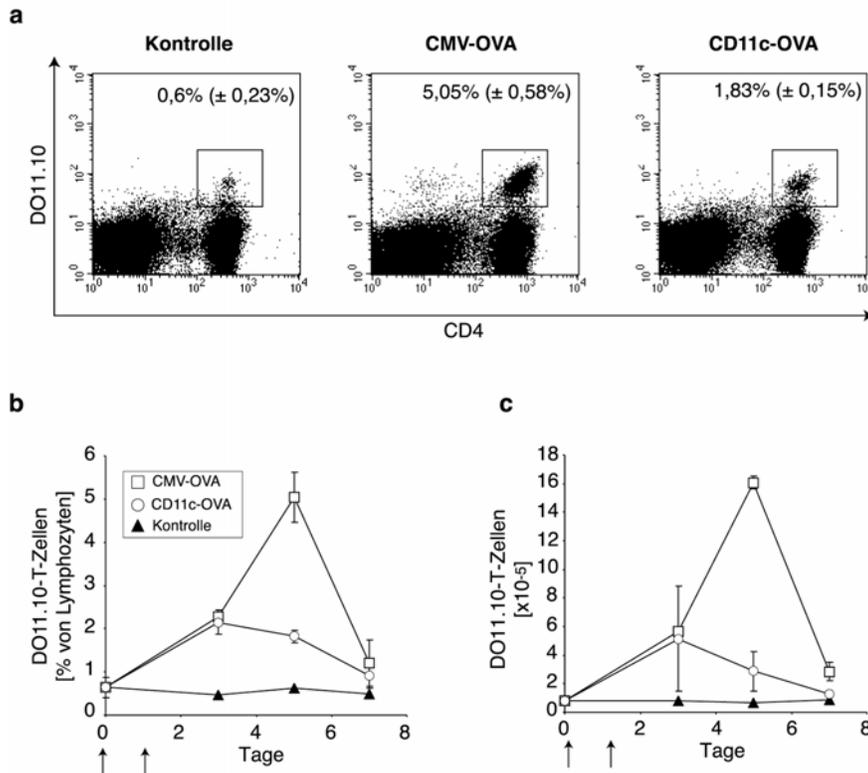


Abb. 5.2: OVA-spezifische CD4-T-Zellantwort nach DNA-Immunisierung. $2,5 \times 10^6$ DO11.10-T-Zellen wurden i.v. in BALB/c-Mäuse injiziert, die einen und zwei Tage später (Tag 0 und 1) mit CMV-OVA oder CD11c-OVA immunisiert wurden. Die Kontrolltiere wurden nicht immunisiert. (a) Die Frequenz transgener DO11.10-Zellen in den inguinalen Lymphknoten wurde per Durchflußzytometrie bestimmt. Zellsuspensionen wurden mit mAb gegen CD4 und den DO11.10-TCR markiert. In den *dot plots* ist der durchschnittliche Prozentsatz (\pm SD) von $CD4^+DO11.10^+$ Zellen in den Lymphknoten fünf Tage nach Immunisierung angegeben. Die Kinetik der DO11.10-T-Zellexpansion ist als Prozentsatz innerhalb aller lebenden Lymphozyten (b) und als absolute Zellzahl (c) dargestellt. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Immunisierungen (n=2 Mäuse/Tag/Gruppe; Kontrolle: n=1 Maus/Tag/Gruppe).

In diesem Experiment wurden die Tiere ein und zwei Tage nach dem Zelltransfer mittels *Gene Gun* immunisiert. In den beiden inguinalen Lymphknoten nicht-immunisierter Kontrollmäuse oder kontroll-immunisierter Mäuse (Daten nicht gezeigt) betrug die Frequenz der DO11.10-T-Zellen durchschnittlich 0,6% ($\pm 0,23\%$) (Abb. 5.2a links). Fünf Tage nach der Immunisierung mit dem CMV-OVA-Plasmid war diese Frequenz durchschnittlich auf 5,05% ($\pm 0,58\%$) angestiegen (Abb. 5.2a Mitte). Die DO11.10-Frequenz in CD11c-OVA-vakzinierten Mäusen betrug an diesem Tag 1,83% ($\pm 0,15\%$) (Abb. 5.2a rechts). Während sich die Frequenz in den Kontrolltieren während des Untersuchungszeitraums nicht veränderte, stieg der Prozentsatz drei Tage nach der ersten

Immunisierung mit CD11c-OVA auf 2,15% ($\pm 0,28\%$) (Abb. 5.2b) und die Anzahl der DO11.10-Zellen um etwa das 7fache von $0,7 \times 10^5$ ($\pm 0,1 \times 10^5$) auf $5,1 \times 10^5$ ($\pm 3,7 \times 10^5$) (Abb. 5.2c). Anschließend nahmen sowohl die Frequenz als auch die absolute Zellzahl wieder ab, so daß an Tag 7 wieder die Ausgangswerte erreicht waren. In CMV-OVA-immunisierten Mäusen kam es ebenfalls zu einer Expansion der DO11.10-T-Zellen. Der Prozentsatz und die Zellzahl waren an Tag 3 ähnlich wie in der CD11c-Gruppe, stiegen aber auf 5,05% ($\pm 0,58\%$) (Abb. 5.2a und b) bzw. 16×10^5 ($\pm 0,4 \times 10^5$) Zellen (Abb. 5.2c) an Tag 5 an. Dies entspricht etwa einer 21fachen Zunahme der transgenen T-Zellen verglichen mit dem Ausgangsniveau. Nach Erreichen des Maximums kam es innerhalb der folgenden zwei Tagen zu einem schnellen Abfall der Werte. Sieben Tage nach der ersten Immunisierung waren nur noch etwa viermal so viel DO11.10-Zellen in den inguinalen Lymphknoten zu finden wie in den Kontrolltieren.

Um nicht nur die Relevanz der beiden Promotoren, sondern auch den Einfluß der zellulären Antigenlokalisierung auf die CD4-T-Zellexpansion zu untersuchen, wurden Mäuse, in die zuvor DO11.10-Zellen adoptiv transferiert wurden, mit den Plasmiden CMV-OVA, $_{-m}$ OVA oder CD11c-OVA, $_{-m}$ OVA immunisiert. Wie in dem Experiment zu Abb. 5.2 festgestellt wurde, erreicht die antigenspezifische Expansion fünf Tage nach CMV-OVA-Immunisierung ihren Maximalwert. Daher wurde davon ausgegangen, daß mögliche Unterschiede zwischen den vier Gruppen an diesem Tag am größten sein sollten. Die Frequenz (Abb. 5.3a) und die Anzahl (Abb. 5.3b) der DO11.10-Zellen in den drainierenden inguinalen Lymphknoten wurde daher fünf Tage nach der Immunisierung bestimmt. In diesem Experiment wurden die Tiere jedoch nur einmal immunisiert. Nach Immunisierung mit CMV-OVA waren an diesem Tag durchschnittlich 6,96% ($\pm 0,18\%$) der Lymphozyten in den untersuchten Lymphknoten DO11.10-T-Zellen (Abb. 5.3a). Dies entsprach einer absoluten Zellzahl von $13,21 \times 10^5$ ($\pm 0,3 \times 10^5$) DO11.10-Zellen (Abb. 5.3b). Während sich die Prozentsätze zwischen CMV-OVA- und CMV- $_{-m}$ OVA-immunisierten Tieren nur geringfügig unterschieden (Abb. 5.3a), konnten in Tieren, die mit dem Konstrukt der membranständigen Ovalbuminform ($_{m}$ OVA) immunisiert wurden, nur $6,33 \times 10^5$ ($\pm 2,56 \times 10^5$) DO11.10-Zellen in den inguinalen Lymphknoten gezählt werden (Abb. 5.3b). Dies sind etwa halb so viel (48%) Zellen wie in der CMV-OVA-Gruppe. In den beiden CD11c-Gruppen konnte keine eindeutige Expansion festgestellt werden. Sowohl die Frequenz als auch die Zellzahl lagen in diesen Gruppen in dem Bereich der nicht-immunisierten Tiere aus dem Experiment zu Abb. 5.2. Die zelluläre Lokalisierung des Antigens spielte dabei keine signifikante Rolle. Lediglich in einer von zwei CD11c-OVA-

immunisierten Mäusen konnte ein Prozentsatz von 1,43% gemessen werden, was in etwa einer Verdopplung der Zellen entspricht.

Neben der Expansion der adoptiv transferierten CD4-T-Zellen wurde auch deren Aktivierungsstatus mit einem mAb spezifisch für CD44 bestimmt (Abb. 5.3c). CD44 ist ein Oberflächenmarker, der auf naiven T-Zellen moderat (Abb. 5.3c, vor Transfer) und auf aktivierten T-Zellen stark exprimiert wird (Abb. 5.3c, nach Immunisierung). Die CD44-Expressionsprofile der DO11.10-T-Zellen in CMV-immunisierten Mäusen unterschieden sich nur marginal (Abb. 5.3c). In beiden Gruppen erhöhte sich die CD44-Expression der gesamten DO11.10-Zellpopulation, so daß etwa 78% der transgenen Zellen einen stark aktivierten Phänotyp aufwiesen (Abb. 5.3d). Nach Immunisierung mit den beiden CD11c-Plasmiden kam es allerdings nur zu einer teilweisen Aktivierung der DO11.10-Zellen. Im Histogramm der CD44-Expression konnten zwei Populationen beobachtet werden: eine mit einer leicht erhöhten und eine mit einer stark erhöhten CD44-Expression (Abb. 5.3c, CD11c-OVA und CD11c-mOVA). In CD11c-OVA-immunisierten Tieren zeigten durchschnittlich 61,54% ($\pm 13,93\%$) der DO11.10-Zellen eine hohe CD44-Expression. Der Prozentsatz in der CD11c-mOVA-Gruppe lag bei 50,1% ($\pm 9,6\%$).

Diese Daten zeigen, daß die DNA-Immunisierung zu einer antigenspezifischen Proliferation TCR-transgener CD4-T-Zellen *in vivo* führt. Die Stärke der Expansion hängt dabei deutlich von der zellulären Antigenform sowie von dem verwendeten Promotor ab. Die stärkste Zunahme der Zellzahl wird durch ubiquitär exprimiertes, lösliches Antigen erreicht (Abb. 5.3b, CMV-OVA). Die Antwort ist bereits um ca. 50% reduziert, wenn das Antigen membranständig ist (Abb. 5.3b, CMV-mOVA) und um ca. 97%, wenn das Antigen membranständig ist und ausschließlich in Dendritischen Zellen exprimiert wird. Wird das Antigen unter der Kontrolle des CD11c-Promotors exprimiert, sind zwei *Gene Gun*-Immunisierungen nötig, um eine messbare Expansion transgener DO11.10-Zellen zu induzieren (Abb. 5.2, CD11c-OVA). Eine einmalige Immunisierung führt lediglich zu einer teilweisen Aktivierung (Abb. 5.3c), aber nicht zu einer Proliferation der transgenen CD4-T-Zellen (Abb. 5.3a und b).

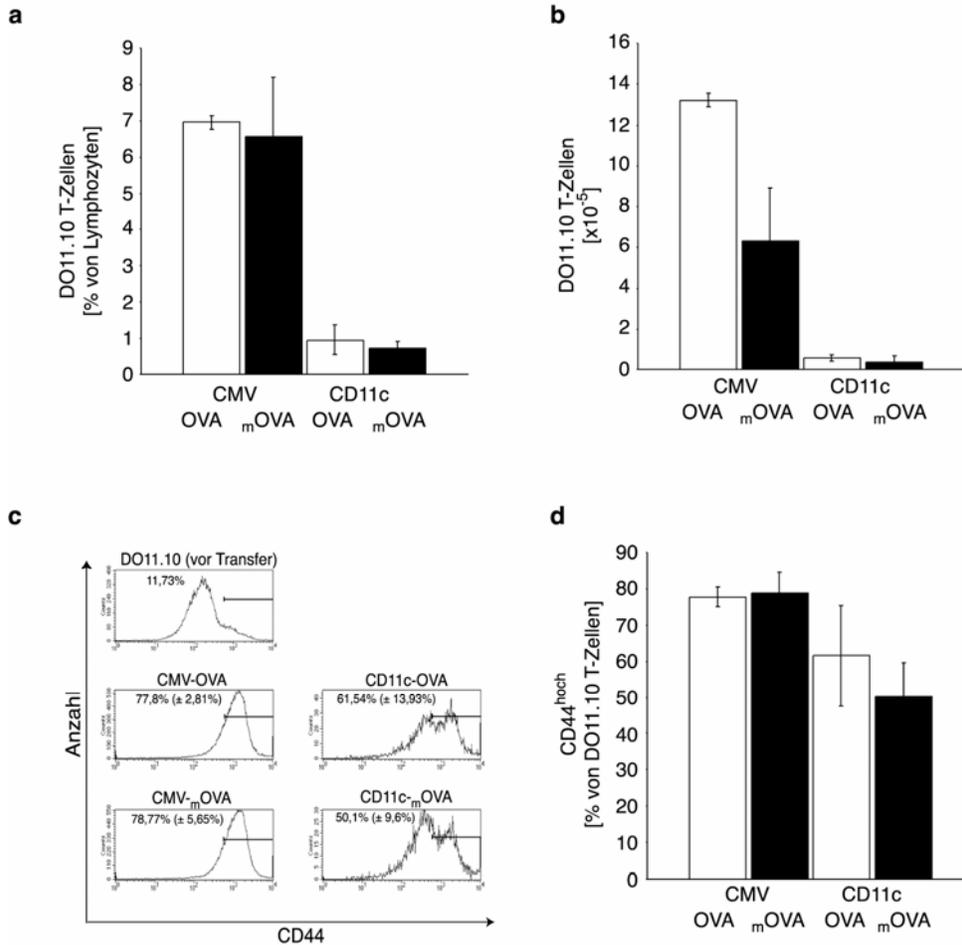


Abb. 5.3: Einfluß der Antigenlokalisierung auf die CD4-T-Zellantwort nach DNA-Immunisierung. BALB/c-Mäuse, in die einen Tag zuvor $2,5 \times 10^6$ DO11.10-Zellen i.v. transferiert wurden, wurden einmalig mit CMV-OVA, CMV-mOVA, CD11c-OVA oder CD11c-mOVA immunisiert. Die Frequenz von DO11.10-T-Zellen in den inguinalen Lymphknoten wurde fünf Tage nach *Gene Gun*-Immunisierung bestimmt. Die Balkendiagramme geben die Frequenz der DO11.10-Zellen als Prozentsatz von allen Lymphozyten (a) und die absolute Zellzahl (b) jeweils \pm SD an. (c) Der Aktivierungsstatus der DO11.10-Zellen wurde vor dem adoptiven Transfer (oben links) und fünf Tage nach der jeweiligen Immunisierung durch Färbung mit anti-CD44 bestimmt. In den Histogrammen und dem Balkendiagramm (d) ist jeweils der durchschnittliche Prozentsatz (\pm SD) von DO11.10-Zellen mit einer hohen CD44-Expression angegeben bzw. dargestellt (n=3 Mäuse/Gruppe).

5.1.3 Einfluß der zellulären Lokalisierung des Antigens auf die CD8-T-Zellantwort

In verschiedenen experimentellen Ansätzen wurde nachgewiesen, daß CD8-T-Zellen einen großen Beitrag zum Schutz vor intrazellulären Bakterien (Übersichtsartikel: [Kaufmann,

1993 #592; Stenger, 1998 #35], viralen Infektionen (Zinkernagel, R.M., 1996) und zur Bekämpfung von Tumoren (Chun, E. *et al.*, 2003; Darcy, P.K. *et al.*, 2000; Dyall, R. *et al.*, 1999; Marzo, A.L. *et al.*, 1999; van Mierlo, G.J. *et al.*, 2002) leisten. Daher sollte die Induktion der CD8-T-Zellantwort durch DNA-Immunisierung untersucht werden.

Mit Hilfe von OVA-spezifischen TCR-transgenen CD8-T-Zellen (OT-1-Zellen) wurde die Fähigkeit der verschiedenen OVA-Konstrukte untersucht, eine antigenspezifische Aktivierung und Expansion von CD8-T-Zellen zu induzieren. OT-1-Zellen sind spezifisch für ein Epitop von Ovalbumin (OVA₂₅₇₋₂₆₄) im Kontext von MHC-I K^b und können mit Antikörpern gegen variable Teile des transgenen TCRs (V α 2 und V β 5.1/5.2) nachgewiesen werden (Abb. 5.4a). Nach adoptiven Transfer von 5×10^6 OT-1-Zellen in syngene C57BL/6-Mäuse betrug deren Frequenz 0,37% (\pm 0,04%) von allen peripheren Blutlymphozyten (PBL) (Abb. 5.4a, Kontrolle). Dieser Prozentsatz änderte sich nicht nach *Gene Gun*-Immunisierung mit CD11c-OVA oder -_mOVA (Abb. 5.4a CD11c-OVA bzw. CD11c-_mOVA). Lediglich in einer CD11c-OVA-immunisierten Maus stieg dieser Wert auf 0,64% an Tag 5 an, erreichte aber an Tag 7 wieder das Ausgangsniveau. Im Gegensatz dazu induzierten beide CMV-Konstrukte eine starke Expansion der OT-1-Zellen (Abb. 5.4a und b CMV-OVA bzw. CMV-_mOVA). Während drei Tage nach der Immunisierung noch keine Veränderung festgestellt werden konnte, waren an Tag 5 bis zu 6,46% in der CMV-OVA-Gruppe und bis zu 9,43% in der CMV-_mOVA-Gruppe aller Lymphozyten im Blut OT-1-Zellen. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen waren nicht signifikant ($p=0,3$). Sieben Tage nach Immunisierung waren die Prozentsätze noch um das drei- bis sechsfache im Vergleich zum Ausgangsniveau erhöht. Die Expansion, dargestellt als Prozent der OT-1-Zellen von allen CD8-positiven PBL, hatte einen ähnlichen Verlauf (Abb. 5.4c). Wie zuvor für die DO11.10-Zellen wurde auch der Aktivierungsstatus der OT-1-Zellen anhand des CD44-Oberflächenmarkers bestimmt. In beiden CD11c-Gruppen nahm die Aktivierung kontinuierlich zu und erreichte schließlich an Tag 7 Werte zwischen 43% und 53% aktivierter OT-1-Zellen (Abb. 5.4d). Wurden die Mäuse mit CMV-Konstrukten immunisiert, zeigten bereits nach fünf Tagen zwischen 85% und 95% der OT-1-Zellen eine starke CD44-Expression. Die Werte stiegen bis zu Tag 7 noch geringfügig weiter, so daß dann nahezu alle OT-1-Zellen einen aktivierten Phänotyp aufwiesen (Abb. 5.4d).

Gene Gun-Immunisierung mit den Konstrukten CMV-OVA und -_mOVA führt zu einer starken Aktivierung und Expansion von OVA-spezifischen transgenen CD8-T-Zellen. Wie zuvor auch für die CD4-Antwort gezeigt (Abb. 5.2b), liegt das Maximum der Expansion im Blut an Tag 5 nach der Immunisierung. Während die lösliche Form des Antigens eine etwa

doppelt so starke CD4-Antwort induzierte wie die membranständige Form (Abb. 5.3b), fiel die CD8-Antwort nach Immunisierung mit CMV-mOVA etwas stärker aus als nach Immunisierung mit dem CMV-OVA-Konstrukt. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Nach einer einzigen Immunisierung mit den beiden CD11c-Vektoren konnte weder eine Expansion der DO11.10- noch der OT-1-Zellen gemessen werden. Allerdings zeigten die jeweiligen transgenen T-Zellen einen aktivierten Phänotyp.

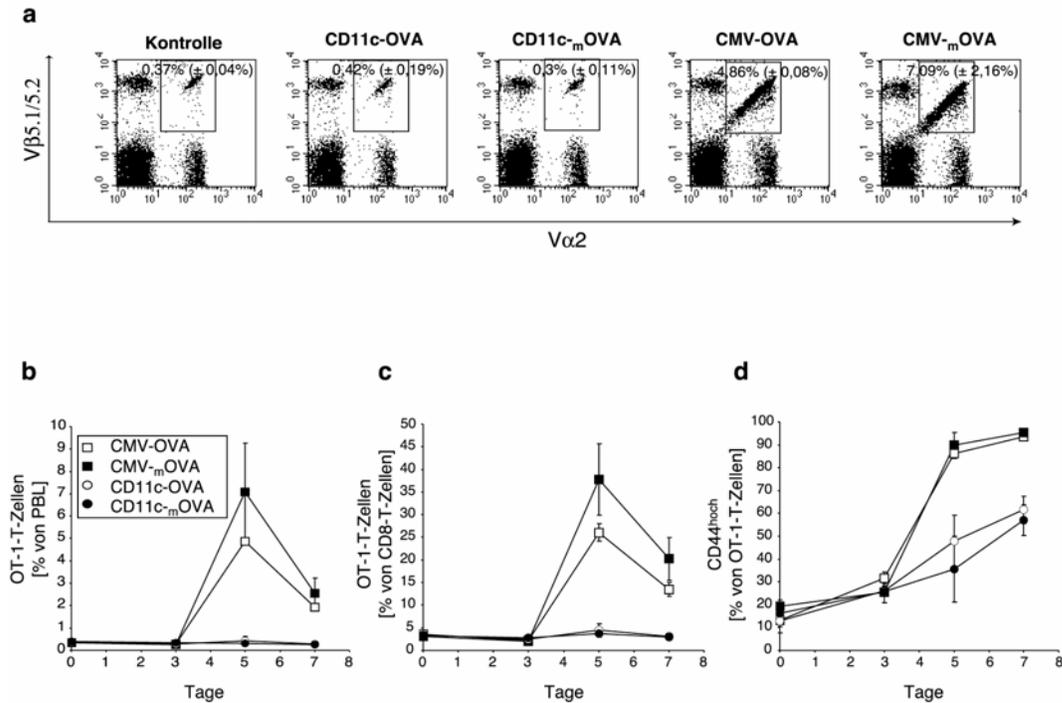


Abb. 5.4: OVA-spezifische CD8-T-Zellantwort nach DNA-Immunisierung. 5×10^6 OT-1-T-Zellen wurden einen Tag vor *Gene Gun*-Immunisierung mit CMV-OVA, CMV-mOVA, CD11c-OVA oder CD11c-mOVA i.v. in C57BL/6-Mäuse injiziert. Vor (Tag 0) und an den angegebenen Tagen nach der Immunisierung wurde die Frequenz der OT-1-Zellen im Blut per Durchflußzytometrie bestimmt. PBL wurden mit anti-CD8, anti-V α 2, anti-V β 5.1/5.2 und anti-CD44 analysiert. (a) Die dot plots zeigen V α 2- und V β 5.1/5.2-Färbungen von CD8⁺ PBL. Angegeben ist jeweils der durchschnittliche Prozentsatz (\pm SD) von OT-1-Zellen (CD8⁺V α 2⁺V β 5.1/5.2⁺) innerhalb der PBL fünf Tage nach Immunisierung. Die Kinetik der OT-1-Zellexpansion ist als Prozentsatz der OT-1-T-Zellen innerhalb aller PBL (b) bzw. innerhalb der CD8-positiven PBL (c) dargestellt. Der Aktivierungsstatus von OT-1-Zellen wurde über die CD44-Expression bestimmt. (d) Die Entwicklung der CD44-Expression über den Untersuchungszeitraum ist als Prozentsatz der OT-1-Zellen mit einer hohen CD44-Expression dargestellt (n=3 Mäuse/Gruppe).

5.2 Die Immunantwort nach Immunisierung mit HSV-1-basierten Vakzinen

Nachdem die Rolle der zellulären Lokalisierung des Antigens und des verwendeten Promotors auf die humorale und zelluläre Immunantwort nach DNA-Immunisierung per *Gene Gun* untersucht wurde, sollte die Funktionalität und Effektivität der DNA-Vakzine mit verschiedenen viralen Impfstoffvektoren verglichen werden. Da das CMV-OVA-Konstrukt sowohl eine starke humorale als auch starke CD4- und CD8-Immunantwort induzierte, wurde die Expressionskassette (hCMV- β Globin-OVA) aus diesem Vektor verwendet, um die viralen Vektoren zu konstruieren. Für diese Studien wurden von P. Marconi (Universität Ferrara, Italien) rekombinante, replikationsinkompetente Herpes Simplex Viren Typ 1 (rHSV-1) sowie von A. Epstein (Universität Lyon 1, Frankreich) HSV-1 Amplikons konstruiert (siehe Einleitung, Material und Methoden). Um die virale Zytotoxizität zu vermindern und die Replikationsinkompetenz des OVA-kodierenden rHSV-1 (HSV-OVA) zu gewährleisten, wurden die essentiellen IE-Gene ICP4 und ICP27 sowie das regulatorische Gen ICP22 deletiert. Die Expressionskassette wurde in den UL41-Lokus inseriert. Amplikons besitzen abgesehen von dem viralen Replikationsursprung (*ori*) und dem Verpackungssignal (*pac*) keinerlei genetische Information des ursprünglichen Virus.

5.2.1 Vergleich der Antikörperantwort nach DNA- und rHSV-1-Immunisierung

Zuerst wurde die Kapazität des rekombinanten HSV-1-Vektors, HSV-OVA, untersucht, die Bildung OVA-spezifischer Antikörper zu induzieren. Als Positivkontrolle diente dabei die *Gene Gun*-Immunisierung mit CMV-OVA. Als Negativkontrolle wurde das rekombinante Virus HSV-GFP, welches eine hCMV-GFP Expressionskassette im UL22-Lokus trägt und kein OVA exprimiert, verwendet. BALB/c-Mäuse wurden intravenös (i.v.) mit den Viren oder per *Gene Gun* immunisiert, und das Serum wurde mittels ELISA auf OVA-spezifische Antikörper untersucht. Während keine der Impfungen zu signifikanten spezifischen IgM-Titern führte (Abb. 5.5a), konnten zu späteren Zeitpunkten spezifische IgG-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 5.5b). 17 Tage nach HSV-OVA- und *Gene Gun*-Vakzinierung wurden ähnliche IgG-Titer in den beiden Gruppen gemessen (Abb. 5.5b, Tag 17). Ein Anstieg nach weiteren drei Wochen wurde allerdings nur in der DNA-immunisierten

Gruppe beobachtet (Abb. 5.5b, Tag 38). Die Analyse von IgG-Isotypen ließ erkennen, daß die *Gene Gun*-Immunisierung eine T_H2-gerichtete Immunantwort mit OVA-spezifischen IgG1-Antikörpern induzierte (Abb. 5.5c), während HSV-OVA zu einer schwachen T_H1-artigen, IgG2a-dominierten Antwort führte (Abb. 5.5d). Es konnten keine OVA-spezifischen Antikörper nach der Kontrollimmunisierung mit HSV-GFP detektiert werden (Abb. 5.5a-d).

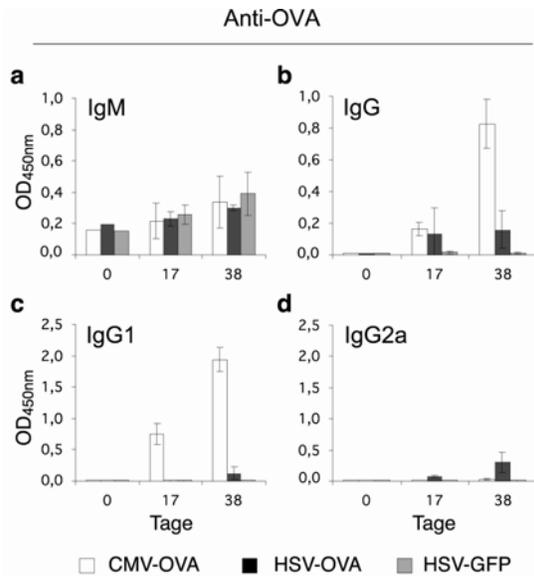


Abb. 5.5: Vergleich der Antikörperantwort nach DNA- oder rHSV-1-Immunisierung. Von CMV-OVA- (*Gene Gun*), HSV-OVA- und HSV-GFP- (jeweils 4×10^6 I.E./Maus i.v.) immunisierten BALB/c-Mäusen wurde vor (Tag 0) sowie 17 und 38 Tage nach Vakzinierung Serum gewonnen. Die Serumtiter OVA-spezifischer Antikörper wurden mittels ELISA gemessen. Das Serum wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden (a) anti-IgM, (b) anti-IgG, (c) anti-IgG1 oder (d) anti-IgG2a verwendet. Der Prä-Immunistatus (Tag 0) jeder Gruppe wurde mit einem Serumgemisch der jeweiligen Tiere bestimmt. Alle Serumproben wurden in Doppelansätzen getestet. Angegeben ist jeweils die durchschnittliche OD_{450nm} (± SD) (n=3-4 Mäuse/Gruppe).

Da bei der *Gene Gun*-Immunisierung die DNA intradermal appliziert wird, und die rekombinanten Viren intravenös injiziert wurden, sollte sichergestellt werden, daß die durch HSV-OVA induzierte sehr schwache Antikörperantwort nicht allein auf die unterschiedliche Vakzinierungsrouten zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde ein ähnliches Experiment durchgeführt, bei dem HSV-OVA nicht nur intravenös, sondern auch intraperitoneal (i.p.), subkutan (s.k.), intranasal (i.n.), intradermal (i.d.) injiziert und topisch (top = auf die Haut) appliziert wurde. Die Serumtiter an OVA-spezifischen Antikörpern wurden 20 Tage nach Immunisierung bestimmt. IgM-Titer über dem Hintergrundniveau (Abb. 5.6a, horizontale Linie) konnten in mindestens einer Maus pro Gruppe nach i.v., i.p., s.k., i.n. und i.d. Injektion beobachtet werden, während kein Tier nach topischer Applikation des Virus OVA-spezifische Antikörper produzierte (Abb. 5.6a). Spezifische IgG-Antworten wurden nur in i.v., s.k. und i.d. immunisierten Mäusen induziert (Abb. 5.6b). Die höchsten Titer wurden in der i.d.-Gruppe gemessen. Die weitere Analyse von

IgG-Isotypen ergab, daß eine s.k. immunisierte Maus hohe IgG1-Titer zeigte, aber kein Tier IgG2a-Antikörper produzierte (Abb. 5.6c und d). Nach i.d. Immunisierung entwickelten alle drei Tiere sowohl hohe IgG1- als auch IgG2a-Titer (Abb. 5.6c und d). Im Gegensatz zu der starken und ausgewogenen Antwort in der i.d.-Gruppe, induzierte die i.v. Impfung wie zuvor (Abb. 5.5) eine schwache IgG2a-dominierte Antwort (Abb. 5.6c und d). Diese Daten zeigen, daß sowohl die Qualität als auch die Quantität der humoralen Immunantwort gegen ein von rHSV-1 kodierte Antigen sehr stark von der Immunisierungsrouten abhängen.

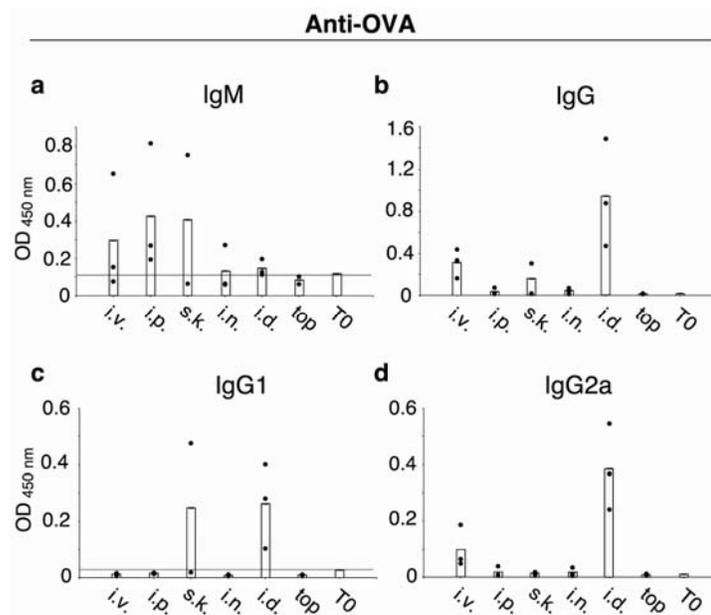


Abb. 5.6: Einfluß der Immunisierungsrouten von HSV-OVA auf die Antikörperantwort. 20 Tage nach Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit HSV-OVA über die angegebenen Routen wurde Serum gewonnen. Die Titer OVA-spezifischer Antikörper wurden mittels ELISA bestimmt. Das Serum wurde in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden (a) anti-IgM, (b) anti-IgG, (c) anti-IgG1 oder (d) anti-IgG2a verwendet. Der Prä-Immunistatus (Tag 0) wurde mit einem Serungemisch von fünf naiven Tieren bestimmt. Die Punkte geben jeweils den Mittelwert der in Doppelansätzen gemessenen OD_{450nm}-Werte eines Tieres an. Die Balken zeigen den Mittelwert der Werte in einer Gruppe an. Die waagerechten Linien (IgM und IgG1) zeigen das Hintergrundniveau von naiven Mäusen an (n=2-3 Mäuse/Gruppe).

5.2.2 Vergleich der CD4-T-Zellantwort nach Immunisierung mit DNA oder rHSV-1

Um im direkten Vergleich das rekombinante Virus HSV-OVA und die DNA-Vakzine bezüglich ihres Potentials, eine CD4-T-Zellantwort zu induzieren, miteinander vergleichen

zu können, wurde wiederum das adoptive Transfersystem mit DO11.10-T-Zellen verwendet (s. Abb. 5.2a). Nach Transfer der DO11.10-Zellen wurden die Mäuse entweder mit der *Gene Gun* oder mit rHSV-1 immunisiert. Da die Antikörperantwort abhängig von der gewählten Injektionsroute war, wurde erwartet, daß dies auch für die CD4-T-Zellantwort zutrifft. Aus diesem Grund wurde HSV-OVA über die vier Routen injiziert, die auch zu einer messbaren Antikörperantwort führten (i.v., s.k., i.p. und i.d.).

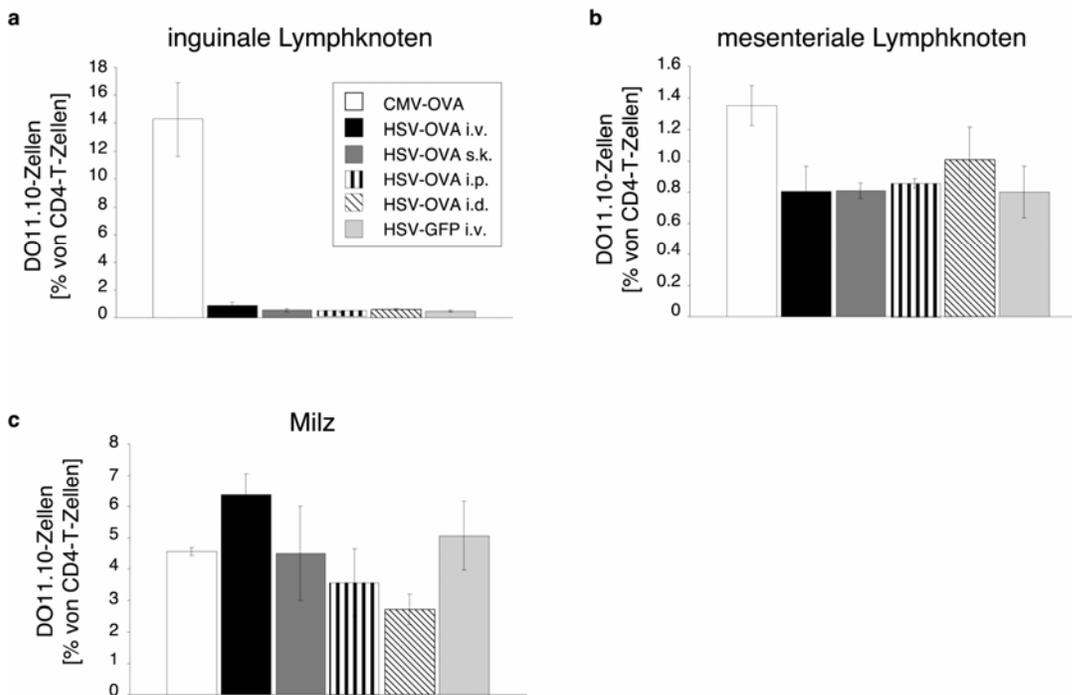


Abb. 5.7: Einfluß der Immunisierungsrouten von HSV-OVA auf die CD4-T-Zellantwort. BALB/c-Mäuse, denen einen Tag zuvor $2,5 \times 10^6$ DO11.10-T-Zellen injiziert wurden, wurden mit CMV-OVA (*Gene Gun*), HSV-OVA oder HSV-GFP (jeweils 4×10^6 I.E./Maus über die angegebenen Routen) immunisiert. Fünf Tage nach Immunisierung wurde die Frequenz der DO11.10-Zellen in den (a) inguinalen und (b) mesenterialen Lymphknoten sowie (c) der Milz per Durchflußzytometrie bestimmt. Angegeben ist jeweils der durchschnittliche Prozentsatz (\pm SD) von DO11.10-Zellen innerhalb der CD4-T-Zellpopulation ($n=3$ Mäuse/Gruppe).

Die Frequenz der DO11.10-Zellen wurde in den inguinalen (Abb. 5.7a) und mesenterialen (Abb. 5.7b) Lymphknoten sowie in der Milz (Abb. 5.7c) fünf Tage nach Immunisierung bestimmt. In den inguinalen Lymphknoten CMV-OVA-immunisierter Mäuse stieg die Frequenz der DO11.10-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (HSV-GFP) bis zu 20fach

(Abb. 5.7a), und die totale Zellzahl bis zu 100fach (Daten nicht gezeigt) an. In den mesenterialen Lymphknoten dieser Tiere stieg die Frequenz nur geringfügig (Abb. 5.7b). Unabhängig von der gewählten Injektionsroute konnte in keinem untersuchten Organ HSV-OVA-immunisierte Mäuse eine signifikante antigenspezifische CD4-T-Zellexpansion gemessen werden. In einem ähnlichen Experiment konnte dagegen eine schwache, aber signifikante Expansion in der Milz sieben Tage nach intravenöser Immunisierung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Immunisierungen mit AMP-OVA oder _{ht}AMP-OVA führten ebenso nur zu schwachen OVA-spezifischen Antikörper- und CD4-T-Zellantworten (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß rHSV-1-Vakzine im Gegensatz zu biologisch applizierten DNA-Vakzinen nur sehr schwache CD4-T-Zellantworten auslösen. Ein direkter quantitativer Vergleich zwischen CMV-OVA- und HSV-OVA-immunisierten Mäusen ist allerdings hier und in den folgenden Experimenten nur bedingt möglich, da sich die Methoden in der Immunisierungsrouten und der applizierten DNA-Menge unterscheiden. Eine Standardisierung beider Methoden ist daher nicht möglich.

5.2.3 Vergleich der monoklonalen CD8-T-Zellantwort nach DNA- und rHSV-1-Immunisierung

Wie bereits für die verschiedenen DNA-Vektoren gezeigt, sollte auch das Potential von rHSV-1 untersucht werden, antigenspezifische CD8-T-Zellantworten zu induzieren. Dazu wurden OT-1-Zellen adoptiv in C57BL/6-Mäuse transferiert. Die Mäuse wurden entweder mit HSV-OVA, HSV-GFP oder mit dem HSV-1-Amplikon AMP-OVA immunisiert. Diese Amplikon-Präparation ist eine Mischung mit variierenden Anteilen des Amplikons und des Helfervirus. Beide OVA-exprimierenden Vakzine induzierten innerhalb der ersten drei Tage eine starke Zunahme der OT-1-Zellen, so daß an Tag 3 bereits das Maximum der Expansion mit einem OT-1-Anteil im Blut von bis zu 50% von allen CD8-positiven Lymphozyten erreicht wurde (Abb. 5.8a). Die Werte fielen innerhalb der nächsten vier Tage wieder ab, waren an Tag 7 aber noch etwa doppelt so hoch wie in HSV-GFP-immunisierten Mäusen, die keinerlei antigenspezifische Expansion zeigten. Zum Vergleich wurden in die Abb. 5.8a und b die Kurven der CMV-OVA-Immunisierung aus den Abb. 5.4b und d eingetragen. Dabei wird deutlich, daß die DNA-Vakzine eine geringere OT-1-Expansion induzierte, die später einsetzte und erst nach fünf Tagen das Maximum erreichte. Sieben Tage nach der Immunisierung konnten in dieser Gruppe allerdings noch 13,4% (\pm

1,6%) OT-1-Zellen von allen CD8-positiven Blutlymphozyten gemessen werden (Abb. 5.8a). Die gleichzeitig gemessene CD44-Expression war in der HSV-OVA- und AMP-OVA-Gruppe nur transient zwischen den Tagen 3 und 5 erhöht, wohingegen die OT-1-Zellen in DNA-immunisierten Tieren nach drei Tagen nur zu einem geringen Prozentsatz aktiviert waren (Abb. 5.8b). Nach fünf Tagen zeigten allerdings durchschnittlich 86% und nach sieben Tagen 93% der OT-1-Zellen eine hohe CD44-Expression. Die Frequenz der aktivierten OT-1-Zellen nach HSV-GFP-Immunsierung war an Tag 5 im Vergleich zum Ausgangsniveau leicht, aber nicht signifikant erhöht.

Diese Daten zeigen, daß sowohl das rekombinante Virus HSV-OVA als auch das Amplikon AMP-OVA in der Lage ist, eine starke und schnelle antigenspezifische CD8-T-Zellantwort zu induzieren.

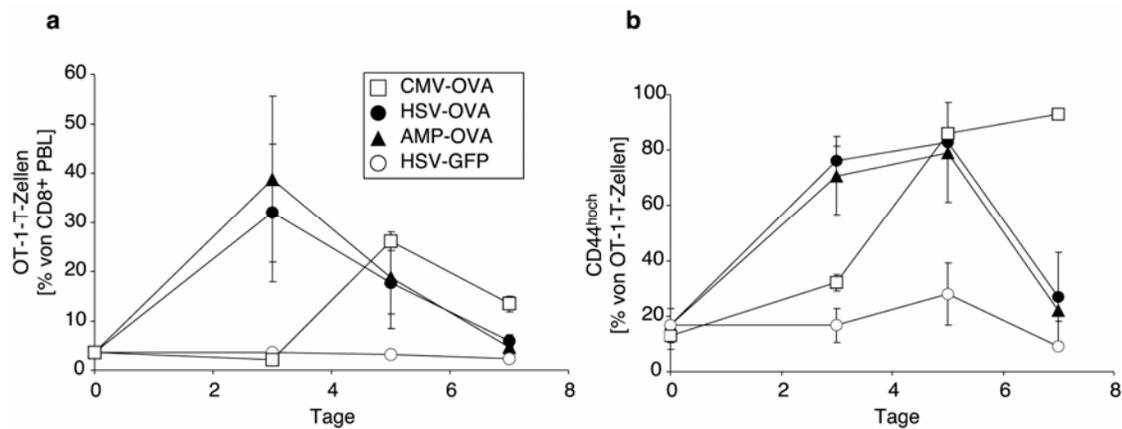


Abb. 5.8: Vergleich der OT-1-Expansion nach DNA-, rHSV-1- oder Amplikon-Immunsierung. 5×10^6 OT-1-T-Zellen wurden adoptiv in C57BL/6-Mäuse transferriert. Die Frequenz der OT-1-Zellen im Blut wurde vor und nach Immunisierung mit HSV-OVA, AMP-OVA oder HSV-GFP (jeweils 4×10^6 I.E./Maus i.v.) mittels Durchflußzytometrie bestimmt. (a) Die Kinetik der OT-1-Expansion ist als durchschnittlicher Prozentsatz (\pm SD) der OT-1-Zellen innerhalb der CD8⁺ PBL dargestellt. Parallel wurde der Aktivierungsstatus der OT-1-Zellen bestimmt. (b) Dargestellt ist der durchschnittliche Prozentsatz (\pm SD) der OT-1-Zellen mit einer hohen CD44-Expression. Die Daten der CMV-OVA-Gruppe stammen aus dem Experiment zu Abb. 5.4c und d und wurden zu Vergleichszwecken in die Abbildungen (a) bzw. (b) übernommen (n=2 Mäuse/Gruppe).

5.2.4 Induktion von CTL-Effektorfunktionen durch Immunisierung mit DNA oder rHSV-1

Die Differenzierung von naiven CD8-T-Zellen in funktionelle CTL benötigt neben der Antigenerkennung auch zusätzliche Stimuli von CD4-T-Zellen und APC. Um zu untersuchen, ob die verschiedenen Vakzine in der Lage sind, diese Bedingungen zu induzieren und damit zu zytotoxischen Effektorzellen führen, wurde das transgene RIP-OVA₁₀-Mausmodell verwendet. In RIP-OVA₁₀-Mäusen wird Ovalbumin unter der Kontrolle des Ratten-Insulin-Promotors (RIP) in den Insulin-produzierenden β -Inselzellen des Pankreas exprimiert. Diese Zellen können dadurch von OVA-spezifischen CTL erkannt und zerstört werden. Durch die Zerstörung der β -Inselzellen, kann kein Insulin mehr produziert werden, und es kommt, ähnlich wie in Diabetespatienten, zu einer Erhöhung der Glukosekonzentration in Blut und Urin.

Da die endogenen T-Zellen in RIP-OVA₁₀-Mäusen tolerant gegen OVA sind, wurden 1×10^6 naive OT-1-Zellen adoptiv transferiert. Anschließend wurden die Tiere mit CMV-OVA, HSV-OVA (4×10^6 und 4×10^5 I.E./Maus) oder HSV-GFP (4×10^6 I.E.) immunisiert oder blieben nicht-immunisiert.

Die Entwicklung der Glukosekonzentration im Urin der einzelnen Mäuse wurde regelmäßig überprüft (Abb. 5.9). Die *Gene Gun*-Immunisierung führte ebenso wie die hohe HSV-OVA-Dosis (4×10^6 I.E./Maus) zu einer dauerhaften Erhöhung der Glukosekonzentration in allen vier Mäusen der jeweiligen Gruppe (Abb. 5.9a bzw. b). Während in der *Gene Gun*-Gruppe erst nach acht Tagen alle Tiere diabetisch waren, war dies in Mäusen, die mit 4×10^6 I.E. HSV-OVA immunisiert waren, bereits nach sechs Tagen der Fall. Dabei konnten in beiden Gruppen sehr hohe Glukosekonzentrationen (167-280 mM) über den gesamten Zeitraum gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Die geringere HSV-OVA-Dosis (4×10^5 I.E./Maus) führte nur in zwei von vier Mäusen zur Entwicklung von Diabetes (Abb. 5.9c). Die Glukosekonzentration war durchschnittlich geringer als in der anderen HSV-OVA-Gruppe, und lag nach 28 Tagen wieder unterhalb der Detektionsgrenze von 5,5 mM. In den HSV-GFP- und nicht-immunisierten Mäusen kam es zu keinem Zeitpunkt zu einem Anstieg der Glukosekonzentration (Abb. 5.9d bzw. e).

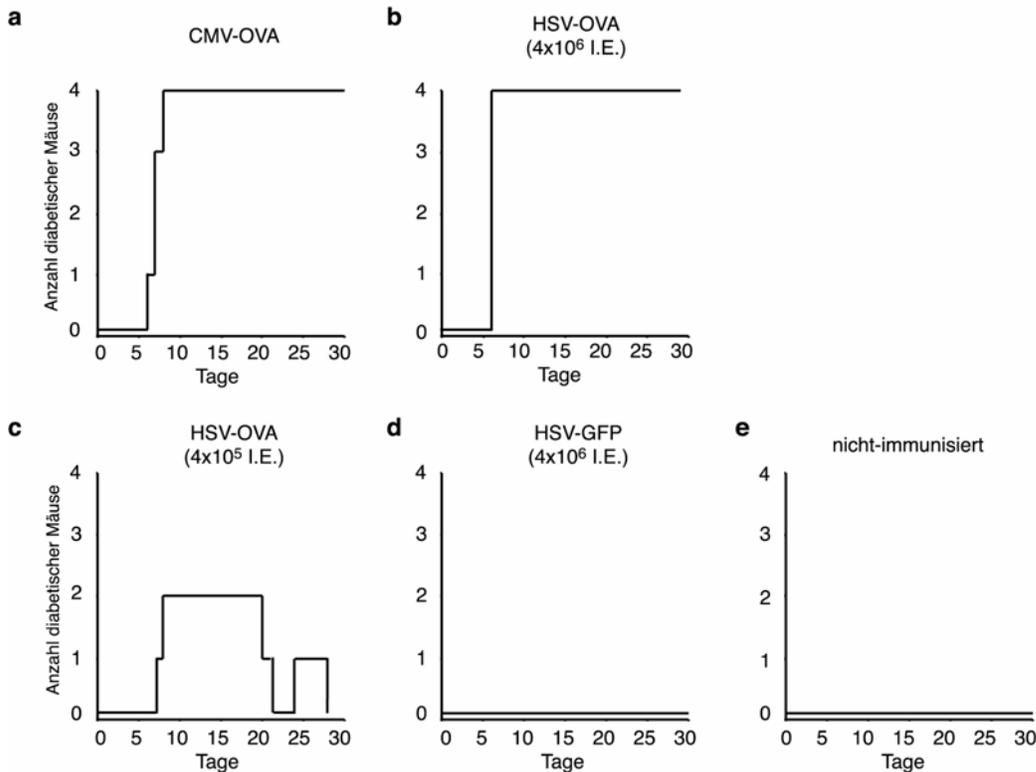


Abb. 5.9: DNA- und rHSV-1-Immunisierungen induzieren funktionelle CTL. 1×10^6 naive OT-1-Zellen wurden adoptiv in RIP-OVA₁₀-Mäuse transferiert. Einen Tag später wurden die Mäuse entweder mit CMV-OVA (*Gene Gun*), HSV-OVA (4×10^6 oder 4×10^5 I.E./Maus, i.v.) oder HSV-GFP (4×10^6 I.E./Maus) immunisiert oder blieben nicht-immunisiert. Die Glukosekonzentration im Urin der Mäuse wurde regelmäßig über einen Zeitraum von 30 Tagen bestimmt. Mäuse wurden für diabetisch befunden, wenn die Glukosekonzentration mindestens 5,5 mmol/l betrug (a-c) n=4; d) n=3; e) n=2 Mäuse/Gruppe).

5.2.5 Vergleich der polyklonalen CD8-T-Zellantwort nach Immunisierung mit DNA oder viralen Vektoren

In den bisher gezeigten quantitativen Analysen der CD8-T-Zellantwort wurde die Anzahl antigenspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten künstlich durch den adoptiven Transfer TCR-transgener CD8-T-Zellen (OT-1-Zellen) erhöht. Antikörper, die spezifisch die V-Regionen, V α 2 und V β 5.1/5.2, des TCRs erkennen, ermöglichten die Detektion der OT-1-Zellen im Durchflußzytometer. Dieses System gibt allerdings nur bedingt darüber Auskunft, wie sich die polyklonalen CD8-T-Zellpopulationen, die natürlicherweise nur in einer sehr niedrigen Frequenz vorkommen, nach einer Vakzinierung verhalten. Um antigenspezifische CTL direkt zu visualisieren, wurden lösliche, tetramere Peptid-MHC-I-Komplexe verwendet. Diese Technik wurde zuerst von Altman *et al.* (Altman, J.D. *et al.*,

1996) beschrieben. Dazu wird die schwere MHC-I-Kette in Gegenwart von β 2-Mikroglobulin und dem gewünschten Peptid *in vitro* gefaltet und anschließend biotinyliert. Durch die Zugabe fluoreszenzmarkierten Streptavidins, welches vier Biotin-Bindungsstellen aufweist, bilden sich tetramere Komplexe, die gleichzeitig mehrere TCR auf einer spezifischen CD8-T-Zelle binden können. Peptid-MHC-I-Tetramere binden CTL mit einer Sensitivität von bis zu 1 in 5000 CD8-T-Zellen (Ogg, G.S. und A.J. McMichael, 1998). Dies erlaubt die Analyse von CTL, die nur in einer geringen Frequenz vorkommen. Für die Detektion OVA-spezifischer CTL in C57BL/6-Mäusen wurden OVA₂₅₇₋₂₆₄/ β 2M/H-2K^b-Tetramere (im Folgenden Tetramere, Tet, genannt) verwendet.

Um die natürliche CTL-Antwort auf verschiedene OVA-kodierende Vakzine zu untersuchen, wurden C57BL/6-Mäuse mit CMV-OVA, HSV-OVA, AMP-OVA oder MVA-OVA immunisiert. MVA-OVA ist ein rekombinantes modifiziertes Vakzina Virus Ankara (MVA) mit einer hCMV-OVA Expressionskassette. MVA-OVA wurde in zwei Dosen eingesetzt (4×10^6 und 10×10^6 I.E./Maus), um zu überprüfen, ob das Limit der OVA-spezifischen CD8-T-Zellexpansion bereits durch die kleinere Dosis erreicht wird, oder ob diese durch eine höhere Vakzinedosis noch weiter gesteigert werden kann. In normalen, nicht-immunisierten C57BL/6-Mäusen betrug die Frequenz OVA-spezifischer CD8⁺Tet⁺ T-Zellen durchschnittlich 0,02% (\pm 0,01%) von allen peripheren Blutlymphozyten (Abb. 5.10a, Tag 0). Dieser Prozentsatz stieg nach CMV-OVA- und Kontroll- (MVA ohne hCMV-OVA Expressionskassette) Immunisierung nicht signifikant an (Abb. 5.10a, CMV-OVA bzw. MVA).

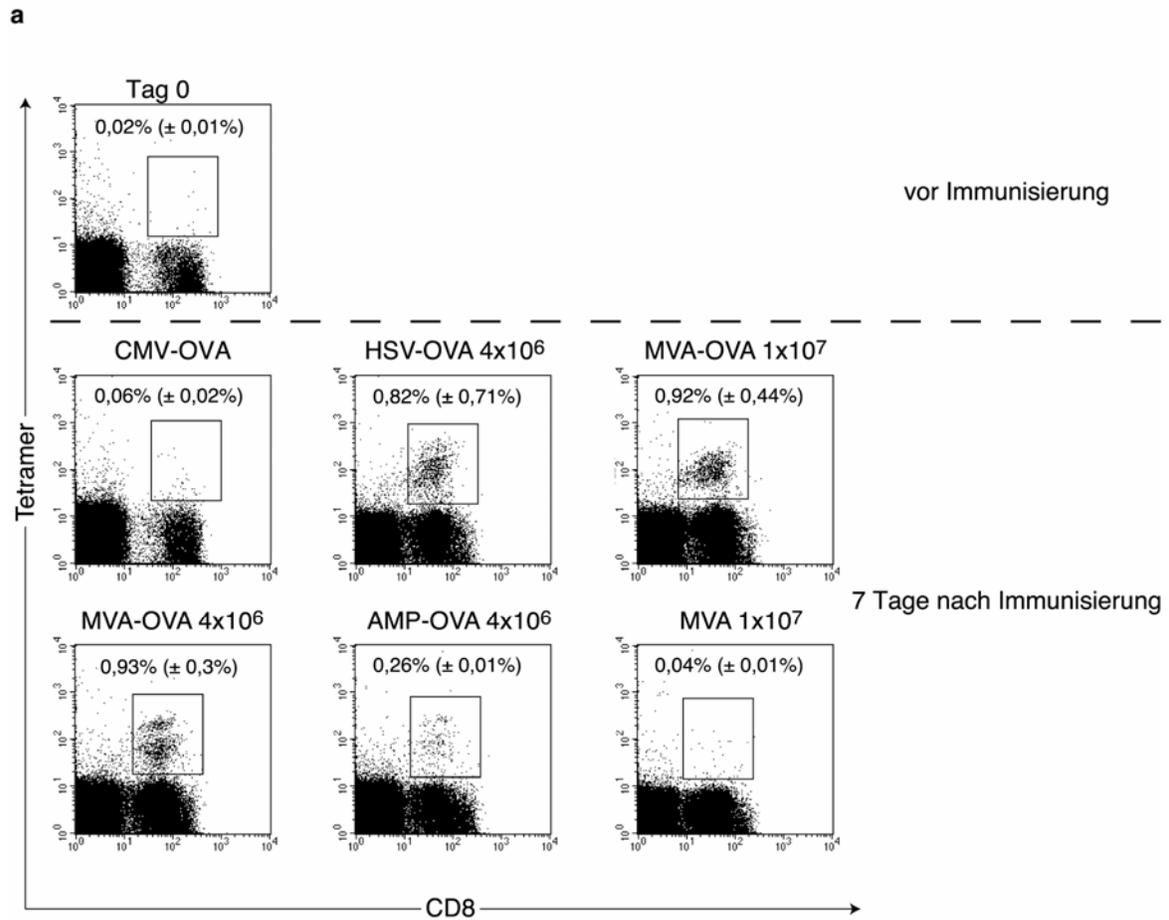


Abb. 5.10a: Analyse der polyklonalen CD8-T-Zellexpansion nach Immunisierung. C57BL/6-Mäuse wurden mit CMV-OVA (*Gene Gun*), HSV-OVA, AMP-OVA (jeweils 4×10^6 I.E./Maus i.v.), MVA-OVA (4×10^6 I.E./Maus und 1×10^7 I.E./Maus, i.v.) und MVA (1×10^7 I.E./Maus, i.v.) immunisiert. PBL wurden mit anti-CD8, anti-CD62L und H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetrameren angefärbt und per Durchflußzytometrie analysiert. (a) Der durchschnittliche Prozentsatz (\pm SD) von CD8⁺Tet⁺ CTL innerhalb der PBL vor (Tag 0) und sieben Tage nach den angegebenen Immunisierungen ist in jedem *dot plot* angezeigt (n=3-4 Mäuse/Gruppe).

Wird jedoch die Kinetik der CD8⁺Tet⁺ T-Zellexpansion als Prozent von allen CD8-T-Zellen dargestellt, ergibt sich eine schwache, aber statistisch signifikante ($p \leq 0,05$) Expansion sieben Tage nach *Gene Gun*-Immunisierung ($0,46\% \pm 0,06\%$) im Vergleich zur Negativkontrolle ($0,14\% \pm 0,01\%$) (Abb. 5.10c). Während die *Gene Gun*-Immunisierung eine nur geringfügig schwächere Expansion von transgenen OT-1-Zellen induzierte als HSV-OVA (Abb. 5.8a), ist die Frequenz polyklonaler CD8⁺Tet⁺ T-Zellen in HSV-OVA-immunisierten Mäusen nach sieben Tagen etwa 14mal so hoch wie in CMV-OVA-immunisierten Tieren (Abb. 5.10a, CMV-OVA bzw. HSV-OVA). Die Expansion OVA-

spezifischer CTL nach HSV-OVA- und MVA-OVA-Vakzinierung war in etwa gleich stark (Abb. 5.10a). Dabei spielte auch die MVA-OVA Dosis keine Rolle. AMP-OVA induzierte eine moderate Expansion ($0,26\% \pm 0,01\%$). Betrachtet man die Kinetik der Expansion, so wird deutlich, daß die Immunisierung mit MVA-OVA zu einer schnelleren Expansion der $CD8^+Tet^+$ T-Zellen führte als mit HSV-OVA (Abb. 5.10b und c). So sind die Frequenzen in den MVA-OVA-Gruppen nach fünf Tagen etwa doppelt so hoch wie in der HSV-OVA-Gruppe. In den darauffolgenden Tagen werden allerdings in allen drei Gruppen ähnliche Prozentsätze erreicht. Die Kinetik nach HSV-OVA- und Amplikon-Vakzinierung ist bis zu Tag 5 gleich. In AMP-OVA-immunisierten Tieren findet aber im Gegensatz zu HSV-OVA-immunisierten Mäusen danach keine deutliche Expansion mehr statt (Abb. 5.10b). Innerhalb der CD8-T-Zellpopulation steigt der durchschnittliche Anteil von Tet^+ Zellen kontinuierlich an und erreicht an Tag 10 einen Wert von $1,88\% (\pm 0,99\%)$ (Abb. 5.10c). Dieser relative Anstieg kommt durch die Kontraktion OVA-unspezifisch expandierter CD8-T-Zellen zustande (Abb. 5.10d). HSV-OVA und MVA-OVA induzierten eine etwa 27fache Zunahme der $CD8^+Tet^+$ T-Zellen innerhalb der CD8-T-Zellen mit dem Höchstwert an Tag 7 ($3,83\% \pm 2,03\%$ bzw. $3,71\% \pm 0,79\%$). Unabhängig von der Darstellung (% von PBL bzw. % von $CD8^+$ PBL) waren keine großen Unterschiede im Kurvenverlauf erkennbar. Die OVA-unspezifische Zunahme von CD8-T-Zellen im peripheren Blut konnte in allen Mäusen, die mit virusbasierten Vakzinen immunisiert worden waren, beobachtet werden. Es fand vorübergehend durchschnittlich eine Verdopplung der CD8-T-Zellpopulation statt (Abb. 5.10d). Bei der Kinetik der CD8-T-Zellexpansion wird deutlich, daß diese antivirale Antwort dosis- und virusabhängig ist. So war in den Tieren, die mit einer hohen MVA-OVA- bzw. MVA-Dosis immunisiert wurden, die höchste Frequenz zu messen. Die Kinetik der Zunahme der CD8-T-Zellpopulation war in der HSV-OVA- und der MVA-OVA- (4×10^6 I.E./Maus) Gruppe ähnlich. Allerdings nahm die Frequenz in HSV-OVA-immunisierten Tieren schneller wieder ab. Der Kurvenverlauf war nach Immunisierung mit den beiden HSV-1-Vektoren (HSV-OVA und AMP-OVA) gleich.

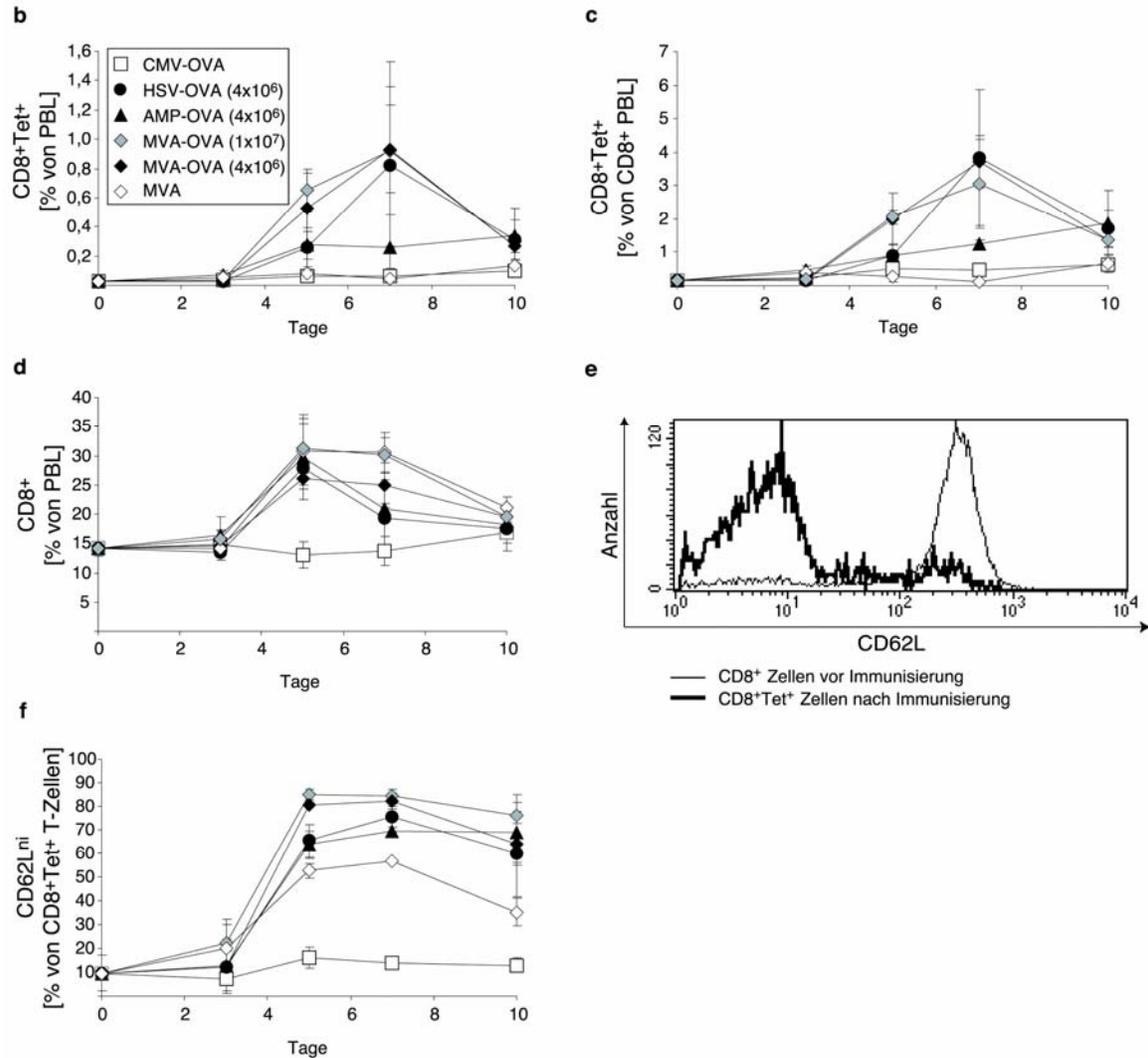


Abb. 5.10b-f: Bestimmung der Kinetik der polyklonalen CD8-T-Zellexpansion nach Immunisierung. Die Frequenz an den angegebenen Tagen nach Vakzinierung (s. Abb. 5.10a) ist als durchschnittlicher Prozentsatz (\pm SD) der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen innerhalb der PBL (b) bzw. innerhalb der CD8-Population der PBL (c) dargestellt. (d) Die OVA-unspezifische CD8-T-Zellexpansion ist als Prozentsatz (\pm SD) der CD8-Lymphozyten innerhalb der PBL dargestellt. Parallel wurde die CD62L-Expression der CD8-T-Zellen analysiert. (e) Das Histogramm zeigt eine Überlagerung zweier Expressionsprofile von den angegebenen Zellpopulationen. (f) Die Kinetik der CD62L-Expression ist als durchschnittlicher Prozentsatz (\pm SD) der CD8⁺Tet⁺ PBL mit einer niedrigen CD62L-Expression dargestellt (n=3-4 Mäuse/Gruppe).

Simultan zu der Expansion wurde auch der Aktivierungsstatus der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen überprüft. Als Marker diente dabei CD62L, ein Oberflächenantigen, welches auf aktivierten T-Zellen weniger exprimiert wird (Abb. 5.10e, dicke Linie) als auf naiven Zellen (Abb. 5.10e dünne Linie). Fünf Tage nach der Immunisierung waren in den beiden MVA-OVA-Gruppen bereits ca. 80% aller CD8⁺Tet⁺ T-Zellen aktiviert (Abb. 5.10f). Anschließend

nahm dieser Wert wieder leicht ab; in der Gruppe mit der kleineren Dosis stärker. In der HSV-OVA- und der AMP-OVA-Gruppe wurden die Maximalwerte von etwa 70% bis 80% erst an Tag 7 erreicht und fielen anschließend ebenfalls leicht ab. In der Negativkontrolle (MVA) fand eine unspezifische Aktivierung statt, die allerdings geringer ausfiel als die spezifische Aktivierung in den OVA-immunisierten Mäusen. Die DNA-Vakzinierung führte zu keiner signifikanten Aktivierung der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen.

Es wurde gezeigt, daß spezifische zytolytische Aktivität signifikant mit dem Prozentsatz von CD8-T-Zellen, die ein bestimmtes HLA-Tetramer binden, assoziiert ist (Ogg, G.S. und A.J. McMichael, 1998). Um die Korrelation zwischen den visualisierten CD8⁺Tet⁺ T-Zellpopulationen (Abb. 5.10a) und ihren Effektorfunktionen zu untersuchen, wurde elf Tage nach Immunisierung ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt. Bei diesem Test wird die antigenspezifische zytolytische Aktivität in immunisierten Mäusen bestimmt. In den Kontrollgruppen (*Gene Gun* und MVA) konnte keine OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifische Lyse der Zielzellen beobachtet werden (Abb. 5.10h). Übereinstimmend mit den detektierten CD8⁺Tet⁺ Populationen in HSV-OVA- und MVA-OVA-immunisierten Mäusen (Abb. 5.10a und b), unterschied sich die lytische Aktivität in den beiden Gruppen nur geringfügig (Abb. 5.10h). Entsprechend dem zeitlichen Verlauf der OVA-spezifischen CD8-T-Zellexpansion in AMP-OVA-vakzinierten Tieren (Abb. 5.10b und c), wiesen die CTL in diesen Mäusen durchschnittlich die höchsten spezifischen Aktivitäten auf. Die Unterschiede zwischen den Gruppen, in denen Effektorfunktionen nachgewiesen werden konnten, sind allerdings aufgrund der großen Schwankungen innerhalb der Gruppen nicht signifikant. Betrachtet man die Prozentsätze der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen der einzelnen Tiere einer Gruppe an Tag 10 und die korrespondierenden Werte im Zytotoxizitätstest, so fällt auf, daß in den Tieren mit den höchsten CTL-Frequenzen meistens auch die höchste lytische Aktivität zu messen war. Das bedeutet, daß von der Frequenz der CD8-T-Zellen, die das OVA₂₅₇₋₂₆₄/β2M/H-2K^b Tetramer binden, Rückschlüsse auf die totale OVA-spezifische, zytolytische Aktivität der vakzinierten Maus gezogen werden können.

Diese Daten zeigen, daß die *Gene Gun*-Immunisierung nur eine sehr schwache Expansion polyklonaler CD8⁺Tet⁺ T-Zellen induzieren konnte, die nicht dazu ausreichte, eine zytolytische Effektorfunktion zu induzieren. Im Gegensatz dazu führte sowohl die Vakzinierung mit HSV-OVA als auch mit MVA-OVA zu einer sehr starken Aktivierung und Proliferation OVA-spezifischer CTL. Die starke Expansion konnte direkt mit einer starken antigenspezifischen, zytolytischen Aktivität korreliert werden. Die Expansion

CD8⁺Tet⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit dem Amplikon AMP-OVA verlief langsamer, führte aber ebenso zur Bildung zytotoxischer Effektorzellen.

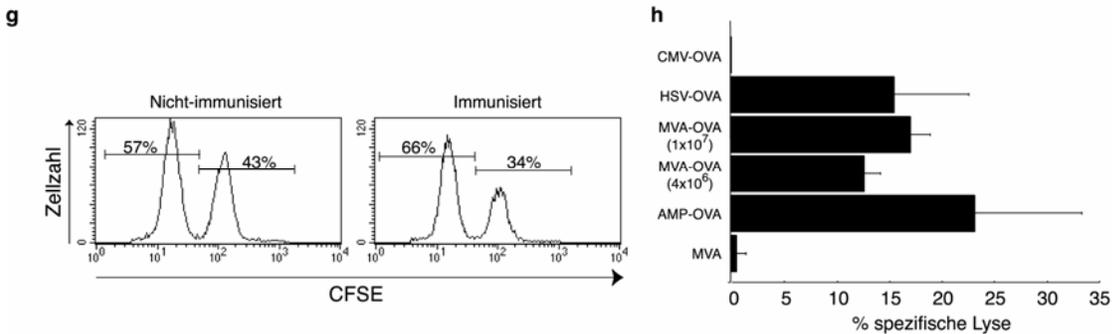


Abb. 5.10g-h: Messung der zytolytischen Effektorfunktion *in vivo*. Die OVA-spezifische, zytolytische Effektorfunktion in den immunisierten Tieren (s. Abb. 5.10a) wurde mit einem *in vivo* Zytotoxizitätstest bestimmt. Dazu wurden syngene Milzzellen mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid beladen und mit einer hohen Konzentration CFSE markiert (CFSE^{hoch}). Zur Kontrolle der Antigen-spezifität wurden nichtbeladene Milzzellen mit einer niedrigen Konzentration markiert (CFSE^{niedrig}). Eine 1:1-Mischung von jeweils 15×10^6 Zellen wurde i.v. in naive Kontrollmäuse und in elf Tage zuvor immunisierte Mäuse injiziert. (g) Nach acht Stunden wurden die Milzen der Tiere entnommen, und der Prozentsatz von CFSE^{hoch}- und CFSE^{niedrig}-Zellpopulation wurde per Durchflußzytometrie analysiert. Das Verhältnis von CFSE^{hoch}- zu CFSE^{niedrig}-Zellpopulationen wurde bestimmt und der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde wie in Material und Methoden angegeben berechnet. (h) Die Balkendiagramme geben den durchschnittlichen Prozentsatz (\pm SD) der spezifischen Lyse in den einzelnen Gruppen wieder (n=3-4 Mäuse/Gruppe).

Da im vorherigen Experiment die Expansion von CD8-T-Zellen nur bis zehn Tage nach der Immunisierung verfolgt wurde, und in der AMP-OVA-Gruppe die Höchstwerte vermutlich noch nicht erreicht wurden, sollte nun die Kinetik über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Außerdem sollte die Rolle des Helfervirus in der Amplikonpräparation AMP-OVA untersucht werden, indem eine Gruppe mit der Helfervirus-freien Variante _{hf}AMP-OVA immunisiert wurde. HSV-OVA induzierte wie schon zuvor eine Zunahme der CD8⁺Tet⁺ T-Zellpopulation im peripheren Blut mit dem Höchstwert sieben Tage nach der Immunisierung (Abb. 5.11a). Der prozentuale Anteil der CD8⁺Tet⁺ Zellen innerhalb aller CD8-positiven Blutlymphozyten war nach 23 Tagen immer noch um das Siebenfache erhöht (Abb. 5.11b). Die Frequenz der OVA-spezifischen CD8-T-Zellen nahm in AMP-OVA-immunisierten Tieren zwischen Tag 5 und Tag 9 kontinuierlich zu und verzeichnete zwischen Tag 11 und 13 einen schnellen und starken Anstieg, so daß an Tag 13 Werte bis zu 3,26% von allen PBL (Abb. 5.11a) bzw. 21,58% von allen CD8-positiven PBL (Abb. 5.11b) erreicht wurden. Anschließend nahm die Frequenz wieder stark ab, war aber nach 23 Tagen noch etwa dreimal so hoch wie in HSV-OVA-vakzinierten Tieren. Die Expansion nach Immunisierung mit der Helfervirus-freien Variante, _{hf}AMP-OVA, verlief langsamer

und war weniger stark als in der AMP-OVA-Gruppe. Die Maximalwerte wurden ebenfalls 13 Tage nach der Immunisierung erreicht und waren an diesem Tag durchschnittlich etwa doppelt so hoch wie nach HSV-OVA-Immunisierung (Abb. 5.11a). Betrachtet man die Prozentsätze der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen innerhalb aller CD8⁺ PBL, wird das Maximum erst nach 16 Tagen erreicht (Abb. 5.11b). Die Aktivierung der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen wurde wiederum über die Messung der CD62L-Expression bestimmt. Während der Verlauf der Aktivierung nach HSV-OVA- und AMP-OVA-Immunisierung annähernd gleich war, erreichten die Tetramer-bindenden CD8-T-Zellen in _{hf}AMP-OVA-immunisierten Tieren erst nach 13 Tagen den gleichen Aktivierungsstatus wie in den anderen beiden Gruppen (Abb. 5.11c). Die CD62L-Expression in der Kontrollgruppe (HSV-GFP) war aufgrund der geringen Frequenz von CD8⁺Tet⁺ T-Zellen nicht zu bestimmen. In allen vier Gruppen fand, wie auch bereits in Abb. 5.10d gezeigt, eine vorübergehende Verdopplung des CD8-T-Zellkompartments statt (Abb. 5.11d). Nach sieben Tagen befanden sich die Werte bis zum Ende des Experiments wieder auf dem Ausgangsniveau.

Um sicherzustellen, daß die Impfstoffvektoren nicht durch Rekombinationsereignisse *in vivo* ihre Replikationskompetenz wiedererlangt haben, wurde im Labor von Dr. A. Epstein in Lyon getestet, ob sich in diesen Proben, im Serum und in peripheren Blutzellen replizierende Viren befanden. 23 Tage nach der Immunisierung wurden daher jeweils zwei Tieren aus jeder Gruppe Blut sowie Gewebeproben der Lunge, der Milz und der Leber entnommen. In keiner der untersuchten Proben konnten Hinweise auf replikationskompetente rHSV-1 gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Wie bereits gezeigt, sind sowohl rHSV-1 als auch Amplikons in der Lage, eine starke antigenspezifische Expansion von CD8-T-Zellen zu induzieren. Vakzinierungen mit Amplikons führten dabei zu den höchsten Werten, wobei innerhalb der jeweiligen Gruppen sehr große Schwankungen zu beobachten waren. Am größten waren die Unterschiede zwischen den Tieren, denen _{hf}AMP-OVA injiziert wurde. In zwei von vier Tieren war keine antigenspezifische Expansion zu beobachten (nicht in die Berechnung der Durchschnittswerte miteinbezogen).

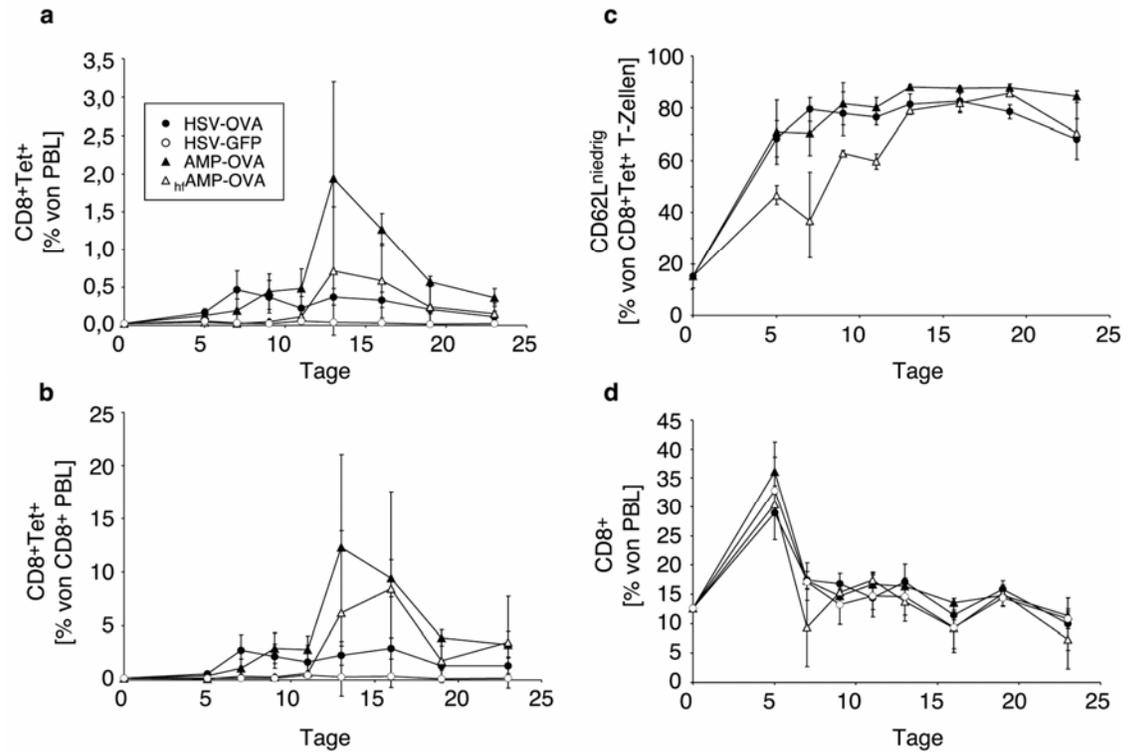


Abb. 5.11: Vergleich der CD8-T-Zellantwort nach Immunisierung mit rHSV-1 oder Amplikons. C57BL/6-Mäuse wurden intravenös mit HSV-OVA, HSV-GFP, AMP-OVA oder $_{\text{hf}}$ AMP-OVA (4×10^6 I.E./Maus) immunisiert. H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramerfärbungen von OVA-spezifischen CD8-T-Zellen im Blut wurden an den angegebenen Tagen durchgeführt. Dargestellt ist die Kinetik der CD8⁺Tet⁺ T-Zellantwort als Prozentsatz (\pm SD) der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen innerhalb der PBL (a) bzw. innerhalb der CD8-positiven PBL (b). Parallel wurde die CD62L-Expression der CD8-T-Zellen analysiert. (c) Die Kinetik der CD62L-Expression ist als durchschnittlicher Prozentsatz (\pm SD) der CD8⁺Tet⁺ PBL mit einer niedrigen CD62L-Expression dargestellt. (d) Die Expansion der CD8-T-Zellen im Blut ist als Prozentsatz (\pm SD) der CD8-Zellen innerhalb der PBL dargestellt (n=4 Mäuse/Gruppe).

5.2.6 Vergleich von CTL-Effektorfunktionen nach Immunisierung mit HSV-1-Vektoren

Um zu untersuchen, ob die unterschiedliche Kinetik der CD8-T-Zellexpansion auch zu einem Unterschied in der Entwicklung der CTL-Effektorfunktion führt, wurde das RIP-OVA₁₀-Mausmodell verwendet. Dazu wurden 1×10^6 OT-1-Zellen adoptiv in RIP-OVA₁₀-Mäuse transferiert, die anschließend entweder mit HSV-OVA, AMP-OVA, $_{\text{hf}}$ AMP-OVA oder HSV-GFP immunisiert wurden.

Die Glukosekonzentration im Urin der immunisierten Tiere wurde über einen Zeitraum von 40 Tagen bestimmt. Die Werte in HSV-OVA-immunisierten Mäusen schwankten stark

(Daten nicht gezeigt), so daß nur zeitweise alle drei Mäuse als diabetisch eingestuft werden konnten (Abb. 5.12a). In zwei von drei HSV-OVA-immunisierten Mäusen waren die Glukosekonzentrationen nur leicht zwischen Tag 8 und Tag 13 erhöht (Daten nicht gezeigt). Die dritte Maus war von Tag 7 an diabetisch, wobei die Werte stark schwankten und nach 21 Tagen wieder unterhalb der Detektionsgrenze von 5,5 mM lagen (Daten nicht gezeigt). Obwohl die Immunisierungen mit beiden Amplikonpräparationen funktionelle CTL, und damit Diabetes induzierten, gab es doch deutliche Unterschiede zwischen diesen Gruppen (Abb. 5.12b und c). Die Mäuse, die mit AMP-OVA immunisiert wurden, waren bereits nach sechs Tagen diabetisch (Abb. 5.12b) und hatten bis zum Ende der Untersuchung hohe Glukosekonzentrationen im Urin (Daten nicht gezeigt). Die Vakzinierung mit dem Helfervirus-freien Amplikon, $_{hf}$ AMP-OVA, führte dagegen nur zu einer vorübergehenden Erhöhung der Glukosekonzentration (Daten nicht gezeigt). Lediglich zwischen Tag 8 und Tag 11 konnten alle drei Mäuse als diabetisch deklariert werden (Abb. 5.12c). In der Kontrollgruppe (HSV-GFP) kam es zu keinem Zeitpunkt zu einer Erhöhung der Glukosekonzentration (Abb. 5.12d).

Alle getesteten Immunisierungsvektoren führten zur Expansion transgener OT-1-Zellen (Daten nicht gezeigt) und induzierten deren Entwicklung zu CTL-Effektorzellen in RIP-OVA₁₀-Mäusen. Jedoch waren sowohl die OT-1-Frequenzen als auch die indirekt über die Glukosekonzentration gemessenen zytolytischen Effektorfunktionen sehr unterschiedlich in den einzelnen Gruppen. Desweiteren war auch die Diabetesinduktion in der HSV-OVA-Gruppe weniger stark und andauernd als in dem Experiment zu Abb. 5.9b und anderen Experimenten (Daten nicht gezeigt).

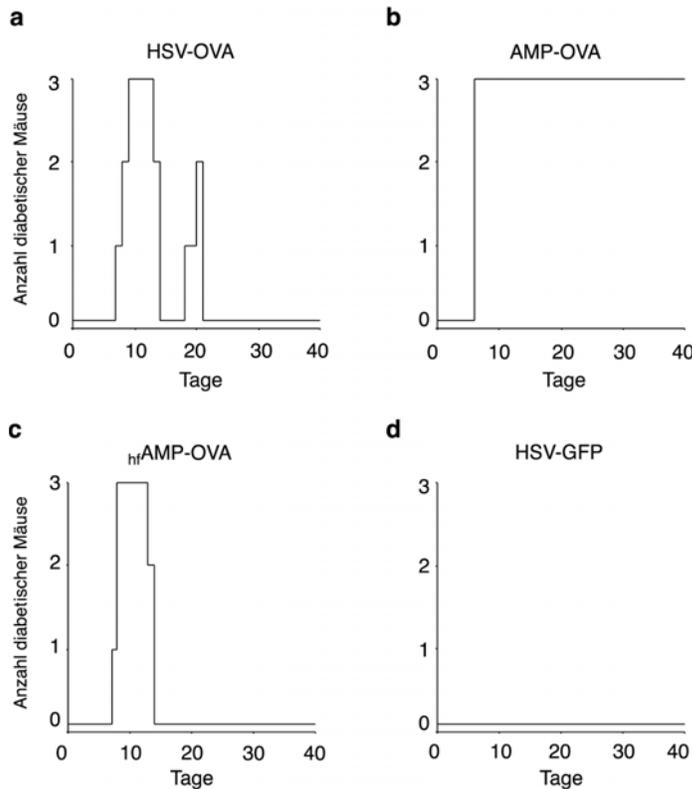


Abb. 5.12: Immunisierung mit viralen Vektoren induziert funktionelle CTL. 1×10^6 naive OT-1-Zellen wurden adoptiv in RIP-OVA₁₀-Mäuse transferiert. Einen Tag später wurden die Mäuse entweder mit HSV-OVA, AMP-OVA, hrAMP-OVA oder HSV-GFP (jeweils 4×10^6 I.E./Maus, i.v.) immunisiert. (a-d) Die Glukosekonzentration im Urin der Mäuse wurde regelmäßig über einen Zeitraum von 40 Tagen bestimmt. Mäuse wurden für diabetisch befunden, wenn die Glukosekonzentration mindestens 5,5 mM betrug (n=3 Mäuse/Gruppe).

5.2.7 Einfluß der Injektionsroute von rHSV-1 auf die CD8-T-Zellantwort

Wie sich gezeigt hat, spielt die Immunisierungsroutefür HSV-OVA eine große Rolle bei der Induktion einer Antikörperantwort. Exemplarisch für die HSV-1-basierten Vakzine sollte nun auch der Einfluß der Immunisierungsroutefür die antigenspezifische CD8-Antwort für HSV-OVA untersucht werden. Als Standard diente dabei die intravenöse Route, die in den bisherigen Experimenten verwendet und beschrieben wurde (Abb. 5.10 und 3.12). Innerhalb der ersten fünf Tage nach der Immunisierung gab es kaum Unterschiede in der CD8⁺Tet⁺ T-Zellexpansion zwischen den verschiedenen Gruppen (Abb. 5.13a). Nach sieben Tagen allerdings, als in der i.v.-Gruppe die Höchstwerte erreicht wurden, zeigten sich deutliche Unterschiede. Mäuse, denen das Virus intraperitoneal injiziert worden war, wiesen die höchsten Prozentsätze auf. Das Maximum wurde in dieser

Gruppe an Tag 10 erreicht. Die subkutane Route induzierte nur eine sehr schwache, nicht signifikante Expansion, die lediglich an Tag 10 über dem Ausgangswert lag. Die Expansion nach intradermaler Injektion verlief langsamer und erreichte erst nach 14 Tagen ihren Höhepunkt. Verglichen mit der Frequenz sieben Tage nach i.v. Immunisierung, lagen die Werte dieser Gruppe an Tag 14 um ca. 38% höher. Weder die intranasale noch die topische Applikation des rekombinanten Virus induzierten eine meßbare Expansion OVA-spezifischer CD8-T-Zellen. Der Aktivierungsstatus der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen wurde wiederum über deren CD62L-Expression bestimmt. Nach drei Tagen zeigten lediglich die Zellen in der i.v.- und der i.p.-Gruppe einen aktivierten Phänotyp (Abb. 5.13b). Dabei waren allerdings in der i.p.-Gruppe bereits doppelt so viele CD8⁺Tet⁺ T-Zellen aktiviert wie in der i.v.-Gruppe. Während etwa 60% der antigenspezifischen Zellen in intradermal vakzinierten Mäusen nach fünf Tagen eine reduzierte CD62L-Expression aufwiesen, war dies in i.p.-immunisierten Tieren erst zwei Tage später der Fall. Die Frequenz der aktivierten CD8⁺Tet⁺ T-Zellen in der s.k.-Gruppe war durchschnittlich etwas geringer als in der i.v.-, i.p.- und der i.d.-Gruppe. Trotz der ausbleibenden Expansion, waren zehn Tage nach intranasaler Immunisierung ca. 50% der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen aktiviert. Im Gegensatz zu den bereits genannten Gruppen, war diese Aktivierung nur vorübergehend und nach 14 Tagen nicht mehr vorhanden. Die topische Applikation des rekombinanten Virus führte zu keiner Aktivierung der OVA-spezifischen Zellen.

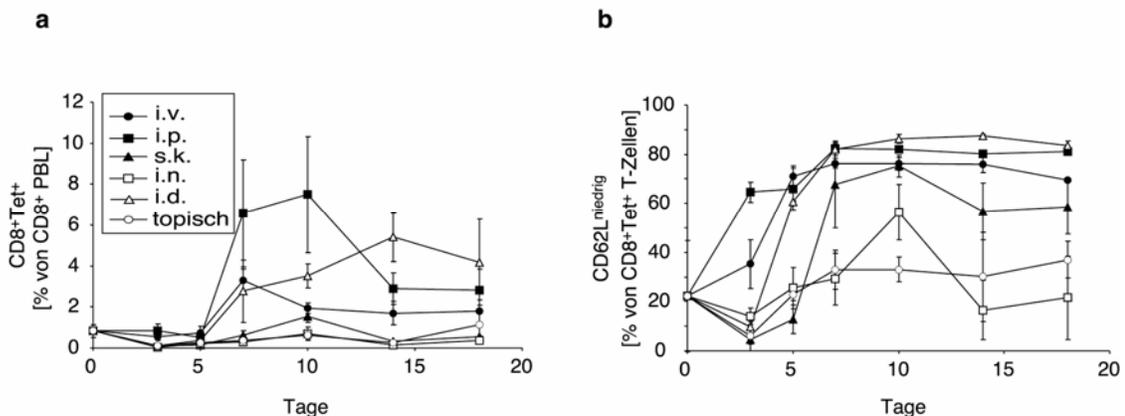


Abb. 5.13: Polyklonale CD8-T-Zellantwort nach Immunisierung mit HSV-OVA über verschiedene Routen. Vor und an den angegebenen Tagen nach der Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit HSV-OVA (4×10^6 I.E./Maus) über die angezeigten Routen wurden H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramerfärbungen von OVA-spezifischen CD8-T-Zellen im Blut durchgeführt. (a) Die Kinetik der Zellexpansion ist als Prozentsatz (\pm SD) der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen innerhalb der CD8⁺ PBL dargestellt. Parallel wurde die CD62L-Expression der CD8-T-Zellen analysiert. (b) Die Kinetik der CD62L-Expression ist als durchschnittlicher Prozentsatz (\pm SD) der CD8⁺Tet⁺ PBL mit einer niedrigen CD62L-Expression dargestellt (n=2-3 Mäuse/Gruppe).

Um zu überprüfen, ob sich die unterschiedliche CD8-T-Zellexpansion nach HSV-OVA-Immunsierung über verschiedenen Routen auch in Unterschieden in der CTL-Effektorfunktion wiederfindet, wurden RIP-OVA₁₀-Mäuse einen Tag nach adoptiven Transfer von 1×10^6 OT-1-Zellen mit HSV-OVA immunisiert. Das Virus wurde dabei i.v., i.p., s.k. oder i.d. injiziert. Die verschiedenen Injektionsrouten führten zu Unterschieden in der Entstehung von Diabetes. So zeigten nur drei der vier i.v. immunisierten Tiere vorübergehend erhöhte Glukosekonzentrationen (Abb. 5.14a). Die i.p. Impfung führte dagegen zu erhöhten Konzentrationen in allen Tieren und am Ende des Untersuchungszeitraums waren noch 50% der Tiere eindeutig diabetisch (Abb. 5.14b). Während die s.k. Vakzinierung im vorherigen Experiment noch eine leichte Expansion OVA-spezifischer CD8-T-Zellen induzierte (Abb. 5.13a), konnte dies im transgenen Mausmodell nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Mäuse hatten auch zu keinem Zeitpunkt eine erhöhte Glukosekonzentration im Urin (Abb. 5.14c). Alle i.d. immunisierten Tiere wurden diabetisch, wobei nach 18 Tagen nur noch zwei Tiere diabetisch waren (Abb. 5.14d). In diesen beiden Tieren konnten hohe OT-1-Frequenzen im Blut nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Glukosekonzentration im Urin dieser beiden Mäuse lag nahezu konstant an der oberen Meßgrenze von 280 mM (Daten nicht gezeigt).

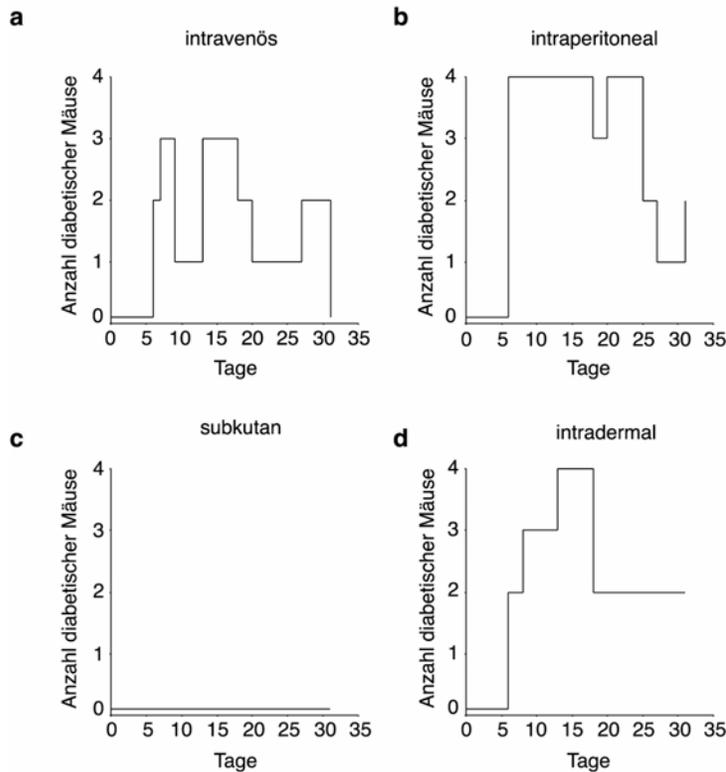


Abb. 5.14: CTL-Induktion durch Immunisierung mit rHSV-1 über verschiedene Routen. 1×10^6 naive OT-1-Zellen wurden adoptiv in RIP-OVA₁₀-Mäuse transferiert. Einen Tag später wurden die Mäuse mit HSV-OVA (4×10^6 I.E./Maus) über die jeweils angegebene Route immunisiert. (a-d) Die Glukosekonzentration im Urin der Mäuse wurde regelmäßig über einen Zeitraum von 31 Tagen bestimmt. Mäuse wurden für diabetisch befunden, wenn die Glukosekonzentration mindestens 5,5 mM betrug (n=4 Mäuse/Gruppe).

Diese Daten zeigen, daß sowohl die Antikörperantwort als auch die CD8-T-Zellantwort von der Injektionsroute von rHSV-1 stark beeinflußt werden. In Tabelle 5.1 sind die Ergebnisse zum Einfluß der Injektionsroute auf die verschiedenen OVA-spezifischen Immunantworten zusammengefaßt. Dabei wird deutlich, daß es Routen gibt, die keine (i.n. und top.) oder nur geringe (s.k.) Immunantworten induzieren, während andere sowohl starke humorale wie auch zelluläre CD8-Antworten hervorrufen (i.d. und i.v.) oder nur sehr starke CD8-T-Zell- und keine Antikörperantworten (i.p.).

Tabelle 5.1: Einfluß der HSV-OVA-Injektionsroute auf die Antikörper- und CD8-T-Zellantwort

Injektionsroute	Höchstwerte der CD8 ⁺ Tet ⁺ T-Zellexpansion	Stärke der CD8 ⁺ Tet ⁺ T-Zellexpansion	Stärke der CTL Effektorfunktion in RIP-OVA ₁₀	Stärke der Antikörperantwort (IgG)
intravenös	Tag 7	++	++	+++
intraperitoneal	Tag 10	++++	++++	-
subkutan	Tag 10	+	-	+
intradermal	Tag 14	+++	+++	++++
intranasal	-	-	nicht bestimmt	-
topisch	-	-	nicht bestimmt	-

- nicht meßbar, + schwach, ++ mittel, +++ stark, ++++ sehr stark

5.3 Impfschutz gegen intrazelluläre Bakterien

5.3.1 Schutz gegen *Listeria monocytogenes*-Infektion durch Impfung mit DNA oder rHSV-1

Nachdem gezeigt wurde, daß das rekombinante Virus HSV-OVA in der Lage ist, eine Antikörper- und sehr starke CTL-Antwort zu induzieren, sollte nun untersucht werden, ob diese Immunantwort ausreicht, um einen Schutz gegen eine Infektion mit dem fakultativ intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* (*LM*) zu gewährleisten. Durch Versuche in *knockout* Mäusen und Versuche, in denen CD8-T-Zellen durch mAb depletiert wurden, konnte deren substantielle Bedeutung für die Resistenz gegen *LM*-Infektionen nachgewiesen werden (Ladel, C.H. *et al.*, 1994; Mittrucker, H.W. *et al.*, 2000; North, R.J., 1973; Shen, H. *et al.*, 1998a). Trotz der, wie in Abb. 5.10c gezeigt, relativen schwachen Ausbildung einer CTL-Expansion, wurde berichtet, daß DNA-Immunisierungen auch vor *LM*-Infektionen schützen können (Cornell, K.A. *et al.*, 1999; Fensterle, J. *et al.*, 1999; Yoshida, A. *et al.*, 2001). Um beide Vakzinierungsstrategien direkt miteinander zu vergleichen, wurden HSV-OVA- und DNA-immunisierte Mäuse mit einer letalen *LM*-OVA Dosis (5×10^4 Bakterien, $2 \times LD_{50}^1$) infiziert. Da in C57BL/6-Mäusen kein endogenes H2-K^b-Peptid von *LM* bekannt ist, wurde die genetisch manipulierte, OVA-exprimierende Variante *LM*-OVA verwendet (Pope, C. *et al.*, 2001). Die Expansion OVA-spezifischer CTL wurde,

¹ Halbletale Dosis

wie im schematischen Versuchsdiagramm gezeigt (Abb. 5.15a), zu zwei Zeitpunkten bestimmt. Die Tetrameranalyse sieben Tage nach Immunisierung (Abb. 5.15b) bestätigte die Ergebnisse aus dem Experiment zu Abb. 5.10c. Es konnte eine starke Zunahme von CD8⁺Tet⁺ T-Zellen in HSV-OVA- und eine schwache, aber signifikante ($p < 0,05$) Zunahme in CMV-OVA-immunisierten Mäusen gezeigt werden. Trotz der geringen CTL-Expansion nach *Gene Gun*-Immunisierung, waren alle Mäuse dieser Gruppe vor einer nachfolgenden *LM*-OVA-Infektion geschützt, wohingegen alle Tiere in den Kontrollgruppen (nicht- oder HSV-GFP-immunisiert) drei bis sechs Tage nach der Infektion verstorben waren (Abb. 5.15c). HSV-OVA-vakzinierte Mäuse waren ebenso geschützt. 18 Tage nach der Immunisierung (zehn Tage nach Infektion) wurde bei der Tetrameranalyse sowohl in der *Gene Gun*-, als auch in der rHSV-1-Gruppe eine erhöhte Frequenz von CD8⁺Tet⁺ T-Zellen in den Milzen nachgewiesen (Abb. 5.15d). Obwohl die durchschnittliche Frequenz in DNA-immunisierten Tieren höher war als in der HSV-OVA-Gruppe, war der Unterschied nicht signifikant. Um die Spezifität des Immunschutzes zu kontrollieren, wurden DNA- und HSV-OVA-immunisierte Mäuse mit Wildtyp *LM* infiziert.

Wie erwartet war keine Gruppe geschützt, und alle Tiere starben an der Infektion (Abb. 5.15e). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von der Kontrollimmunisierung mit HSV-GFP (Abb. 5.15c) kann damit ausgeschlossen werden, daß der Schutz vor einer *LM*-OVA Infektion durch eine unspezifisch induzierte Immunreaktion hervorgerufen wurde. Diese Daten zeigen weiterhin, daß sowohl eine DNA-, als auch eine rHSV-1-Immunisierung ausreichend ist, um Mäuse vor einer Infektion mit intrazellulären Bakterien zu schützen.

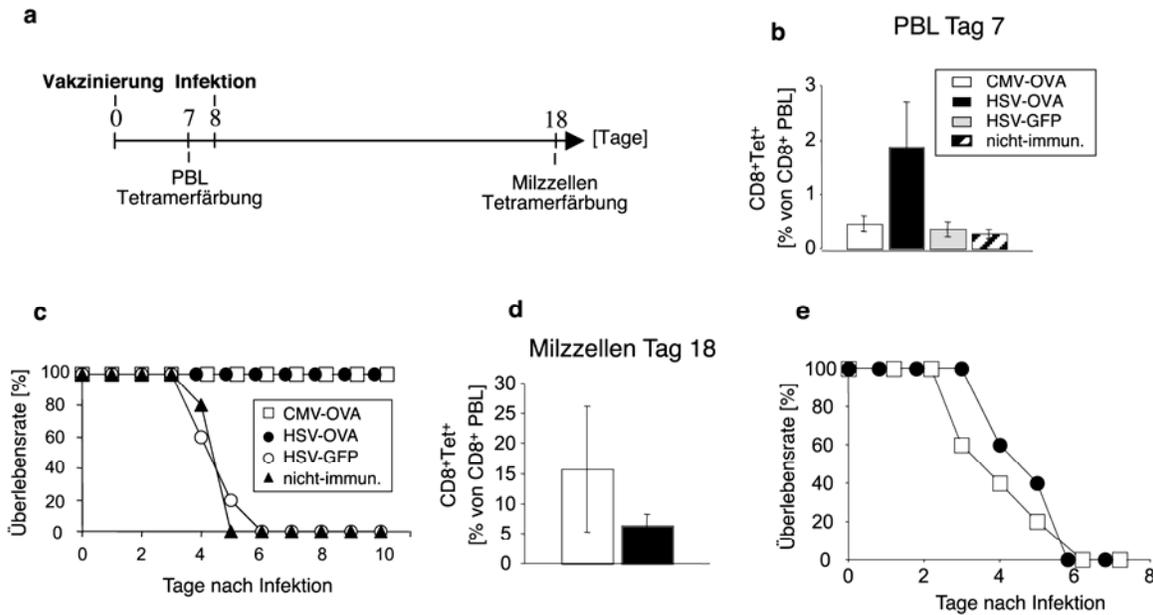


Abb. 5.15: Schutz gegen *LM*-OVA-Infektion. (a) Experimentelles Protokoll: C57BL/6-Mäuse blieben nicht-immunisiert oder wurden mit CMV-OVA (*Gene Gun*), HSV-OVA oder HSV-GFP (jeweils 4×10^6 I.E./Maus, i.v.) vakziniert (Tag 0) und wurden acht Tage später mit 5×10^4 ($2 \times LD_{50}$) *LM*-OVA infiziert. (b) H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramerfärbungen von OVA-spezifischen CD8-T-Zellen im Blut wurden an Tag 7 durchgeführt. Das Balkendiagramm gibt die durchschnittliche Frequenz (\pm SD) der CD8⁺Tet⁺ Zellen innerhalb der CD8⁺ PBL an. (c) Das Überleben der Mäuse wurde für zehn Tage beobachtet. (d) An Tag 18 wurde die Frequenz von CD8⁺Tet⁺ T-Zellen in den Milzen der überlebenden Tiere analysiert. Das Balkendiagramm (Legende wie in b) zeigt die durchschnittliche Frequenz (\pm SD) der CD8⁺Tet⁺ Zellen innerhalb der CD8-T-Zellen an ($n=5$ Mäuse/Gruppe). (e) Als Kontrolle für die Antigen-spezifität des Schutzes wurden immunisierte Mäuse mit 1×10^5 Wildtyp *LM* (ohne OVA-Expression) infiziert. Die Überlebensrate in Prozent ist über einen Zeitraum von sieben Tagen dargestellt ($n=4$ Mäuse/Gruppe).

5.3.2 Vakzinierung mit rHSV-1 schützt vor Infektion mit hohen *LM*-OVA-Dosen

Obwohl die DNA-Immunisierung zu deutlich geringeren Mengen an OVA-spezifischen CTL führte als HSV-OVA, waren beide Gruppen vor einer letalen ($2 \times LD_{50}$) *LM*-OVA Dosis geschützt (Abb. 5.15). Die Frage war nun, ob die DNA-Impfung auch vor einer höheren Dosis schützen kann. Aus diesem Grund wurde das Experiment zu Abb. 5.15 wiederholt. Allerdings wurden die Mäuse nach der Immunisierung mit einer doppelt so hohen *LM*-OVA Menge infiziert (1×10^5 , $4 \times LD_{50}$). Drei Tage nach der Infektion wurden die Milzen und Lebern auf das Vorhandensein von lebenden *Listeria* getestet.

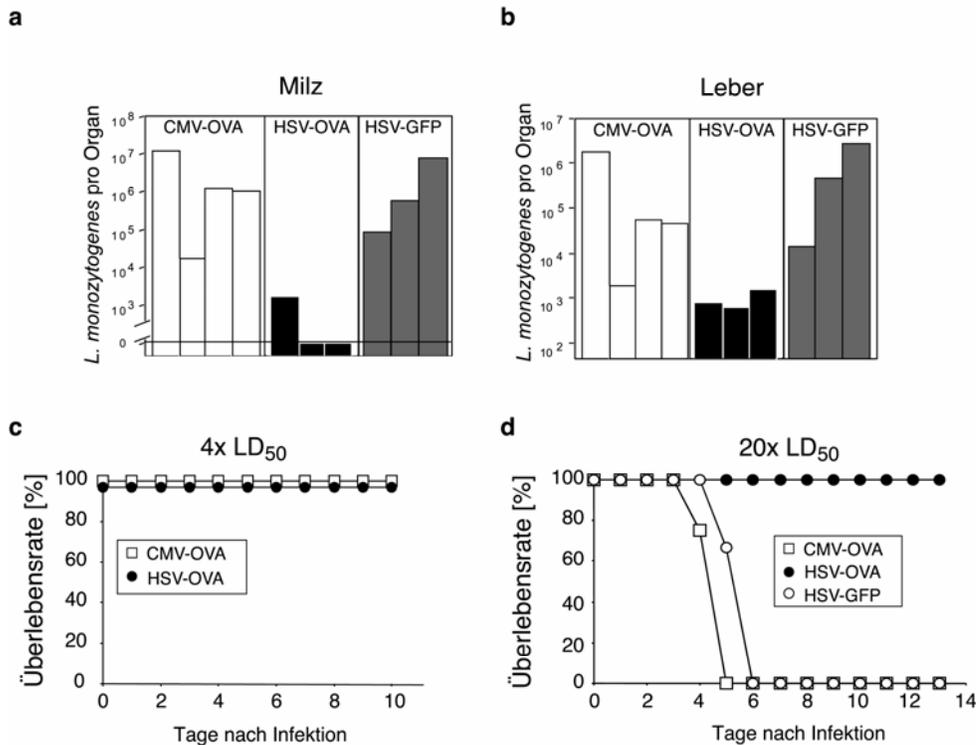


Abb. 5.16: Schutz gegen Infektion mit einer hohen LM-OVA-Dosis. C57BL/6-Mäuse wurden mit CMV-OVA (*Gene Gun*), HSV-OVA oder HSV-GFP (jeweils 4×10^6 I.E./Maus, i.v.) vakziniert und sieben Tage später mit 1×10^5 ($4 \times \text{LD}_{50}$) LM-OVA infiziert. Drei Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet, und die Anzahl lebender Listerien in der Milz (a) und der Leber (b) wurde bestimmt ($n=3-4$ Mäuse/Gruppe). (c) CMV-OVA- und HSV-OVA-immunisierte Tiere wurden mit der gleichen LM-OVA-Dosis infiziert. Das Überleben der Mäuse wurde über einen Zeitraum von zehn Tagen beobachtet ($n=3$ Mäuse/Gruppe). Wie in (a) immunisierte Mäuse wurden mit 5×10^5 ($20 \times \text{LD}_{50}$) LM-OVA infiziert, und das Überleben wurde über einen Zeitraum von 13 Tagen beobachtet ($n=4$ Mäuse/Gruppe).

Dabei wurden signifikante Unterschiede zwischen der *Gene Gun*- und der HSV-OVA-Gruppe deutlich: Die Milzen aus zwei von drei HSV-OVA-vakzinierten Tieren waren frei von Listerien, und die Bakterienanzahl in der dritten Milz war etwa 6000fach geringer als in der *Gene Gun*-Gruppe (Abb. 5.16a). Die Anzahl lebender Listerien war in der *Gene Gun*-Gruppe ähnlich hoch, wie in der Kontrollgruppe (HSV-GFP). Die Analyse der Lebern ergab ein vergleichbares Bild. Die Listerienmenge war in HSV-OVA-vakzinierten Tieren durchschnittlich mehr als 430mal geringer als in CMV-OVA- und HSV-GFP-immunisierten Mäusen (Abb. 5.16b). In einem Kontrollversuch konnte dennoch gezeigt werden, daß DNA-immunisierte Mäuse nach einer Infektion mit derselben Dosis überleben (Abb. 5.16c). Sie wiesen allerdings in der ersten Woche nach der Infektion deutliche Krankheitssymptome auf, wie z.B. struppiges Fell, Schwitzen und generelle Schwäche,

erholten sich aber vollkommen (Daten nicht gezeigt). Somit konnte davon ausgegangen werden, daß die geringere CTL-Expansion in DNA-immunisierten Mäusen mit der höheren Bakterienbelastung in den untersuchten Organen und den deutlichen Symptomen einer Infektion korreliert. Um die Grenzen des Immunschutzes nach der DNA-Impfung zu eruieren, wurden Mäuse mit einer im Vergleich zu Abb. 5.15 zehnfach höheren *LM-OVA* Dosis (5×10^5 , $20 \times LD_{50}$) infiziert. Während HSV-OVA-immunisierte Mäuse ohne äußerlich erkennbare Krankheitssymptome überlebten, starben alle Tiere in der DNA- und der Kontrollgruppe nach drei bis sechs Tagen (Abb. 5.16d). Diese Ergebnisse machen deutlich, daß der durch die DNA-Impfung induzierte Immunschutz Mäuse zwar vor einer geringen bis mittleren *LM-OVA* Dosis schützt, aber im Gegensatz zur HSV-OVA-Immunsierung nicht ausreicht, um die Tiere vor einer sehr hohen Infektionsdosis zu schützen.

5.3.3 Langzeitschutz durch DNA- und rHSV-1-Vakzinierung gegen Listerieninfektion

Die Induktion einer langfristigen Gedächtnisantwort ist eine Grundvoraussetzung für die optimale Effizienz einer Vakzine. Um zu untersuchen, ob die DNA- und die rHSV-1-Vakzine in der Lage sind, einen langfristigen Immunschutz gegen intrazelluläre Bakterien zu etablieren, wurden Mäuse sechs Wochen nach Immunisierung mit einer letalen *LM-OVA* Dosis (5×10^4 , $2 \times LD_{50}$) infiziert. Die OVA-spezifische CTL-Expansion wurde entsprechend dem Versuchsschema (Abb. 5.17a) sowohl vor als auch nach der Infektion gemessen (Abb. 5.17b). Wie bereits zuvor gezeigt (Abb. 5.10c), findet eine vorübergehend starke Expansion nur nach HSV-OVA-Immunsierung statt (Abb. 5.17b, Tag 7). Nach 39 Tagen war die Frequenz der $CD8^+Tet^+$ T-Zellen wieder auf dem Hintergrundniveau. Eine signifikante Erhöhung dieser Frequenz konnte erst fünf Tage nach der Bakterieninfektion in HSV-OVA-vakzinierten Mäusen festgestellt werden (Abb. 5.17b, Tag 47). Während an diesem Tag bereits 20% aller CD8-T-Zellen im Blut Tet^+ waren, konnten erhöhte $CD8^+Tet^+$ T-Zell-Level in *Gene Gun*-immunisierten Tieren erst sieben Tage nach der Infektion gemessen werden (Abb. 5.17b, Tag 49). Die Werte waren zu diesem Zeitpunkt allerdings noch etwa 6fach geringer, als in der HSV-OVA-Gruppe.

Trotz der stark unterschiedlichen CTL-Frequenz induzierten beide Impfungen (CMV-OVA und HSV-OVA) einen langfristigen Immunschutz vor der Infektion mit einer niedrigen *LM-OVA*-Dosis (Abb. 5.17c). In beiden Gruppen überlebten die Tiere ohne Anzeichen einer Krankheit, wohingegen die Tiere in der HSV-GFP-Kontrollgruppe innerhalb der

ersten sechs Tage nach der Infektion verstarben (Abb. 5.17c). Sieben Tage nach der Infektion wurden die überlebenden Tiere getötet und ihre Milzen und Lebern auf das Vorhandensein von Listerien untersucht. Die Milzen von allen Tieren beider Gruppen waren bakterienfrei (Daten nicht gezeigt). Während die Lebern von HSV-OVA-vakzinierten Mäusen ebenfalls frei von Listerien waren, konnten in 50% der *Gene Gun*-immunisierten Tiere noch Listerien in der Leber nachgewiesen werden (3×10^4 bis 9×10^4 Listerien pro Leber, Daten nicht gezeigt). Diese Daten implizieren, daß die rHSV-1-Vakzine eine vollständigere oder schnellere Klärung der Listerieninfektion induziert. Bei der Messung des Gewichts der entnommenen Milzen und Lebern fielen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf (Daten nicht gezeigt).

Die sehr viel höhere CTL-Frequenz in HSV-OVA-immunisierten Tieren ist ein systemisches Phänomen, was nicht nur im peripheren Blut, sondern auch in den Milzen von überlebenden Tieren beobachtet werden kann (Abb. 5.17d). Auch in den mesenterialen Lymphknoten HSV-OVA-immunisierter Tiere konnten signifikant höhere Mengen von CD8⁺Tet⁺ T-Zellen gemessen werden als in der *Gene Gun*-Gruppe ($p < 0,005$). Der Unterschied war allerdings nicht so hoch, wie in der Milz oder im Blut. Diese Analyse schließt die Möglichkeit aus, daß die im Blut gefunden Unterschiede nach rHSV-1- und *Gene Gun*-Immunsierung auf unterschiedliche „*homing*“-Eigenschaften der stimulierten Zellen zurückzuführen sind.

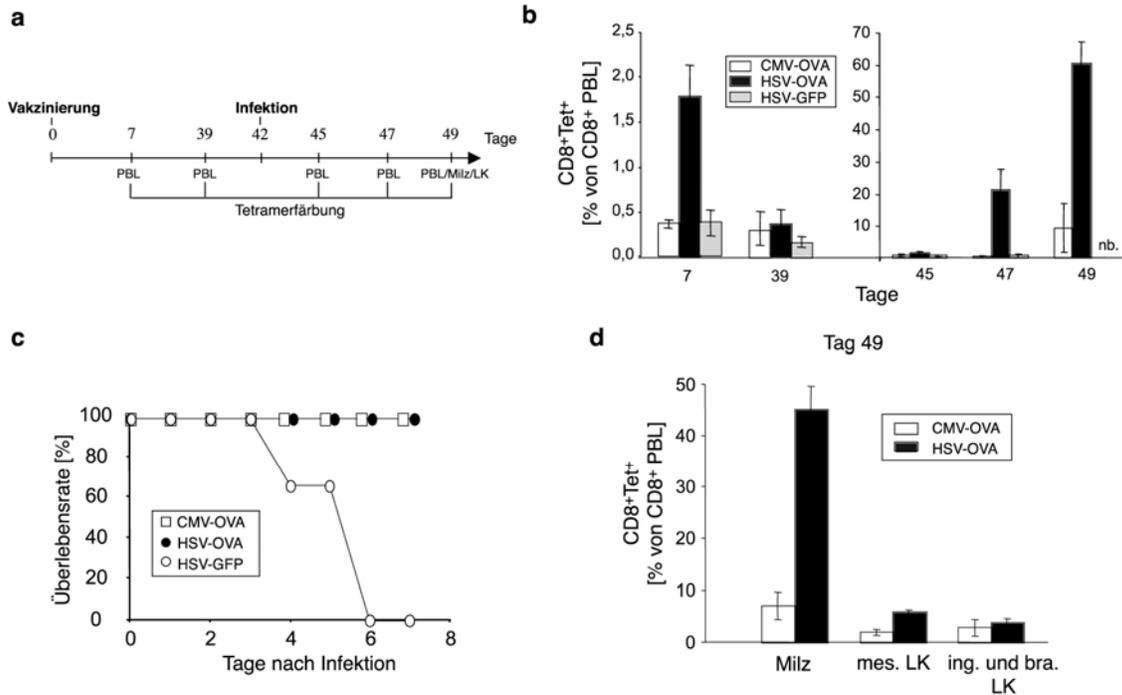


Abb. 5.17: Langzeitschutz gegen Infektion mit LM-OVA. (a) Experimentelles Protokoll: C57BL/6-Mäuse wurden mit CMV-OVA (*Gene Gun*), HSV-OVA oder HSV-GFP (jeweils 4×10^6 I.E./Maus, i.v.) vakziniert und 42 Tage später mit 5×10^4 ($2 \times LD_{50}$) LM-OVA infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Frequenz von CD8⁺Tet⁺ T-Zellen im Blut per Durchflußzytometrie bestimmt. (b) Das Balkendiagramm zeigt die Frequenz als durchschnittlichen Prozentsatz (\pm SD) der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen innerhalb der CD8⁺ PBL an. (c) Das Überleben der Mäuse wurde täglich beobachtet. Sieben Tage nach der Infektion (Tag 49) wurden Milz, inguinale, brachiale und mesenteriale Lymphknoten isoliert und durchflußzytometrisch analysiert. Die inguinalen und brachialen Lymphknoten jeder Maus wurden vereint. (d) Im Balkendiagramm ist der durchschnittliche Prozentsatz (\pm SD) der CD8⁺Tet⁺ innerhalb der CD8⁺-T-Zellen in den angegebenen Organen dargestellt (n=4-5 Mäuse/Gruppe).

Ein Teil der entnommenen Milzen wurde dazu verwendet, intrazelluläre Färbungen für TNF- α und INF- γ durchzuführen. Trotz der Befunde von Bevan und Harty (Harty, J.T. und M.J. Bevan, 1995), daß die durch CD8-T-Zellen gewährleistete Immunität gegen *LM* nicht von deren INF- γ Sekretion abhängt, konnte gezeigt werden, daß der Schutz durch CD4-T-Zellen dieses Zytokin benötigt (Bhardwaj, V. *et al.*, 1998). Das u.a. von Makrophagen sezernierte Zytokin TNF- α spielt eine wichtige Rolle bei der lokalen Eingrenzung einer bakteriellen Infektion. Die essentielle Bedeutung von TNF- α für die Resistenz gegen Listerieninfektionen konnte mehrfach belegt werden (Havell, E.A., 1987; Havell, E.A., 1989; Nakane, A. *et al.*, 1988). Um die Zytokinexpression der CD8-T-Zellen zu bestimmen, wurden die Milzzellen vor der intrazellulären Färbung mit dem MHC-I Epitop

OVA₂₅₇₋₂₆₄ inkubiert. Sowohl in DNA- als auch in rHSV-1-immunisierten Mäusen produzierte nur ein geringer Anteil der OVA-spezifischen CD8-T-Zellen TNF- α (Abb. 5.18a und c). Obwohl in den Milzen HSV-OVA-immunisierter Mäuse ca. 45% aller CD8-T-Zellen OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifisch waren (Abb. 5.18d), produzierten nach Stimulierung nur 10,7% (\pm 2,4%) INF- γ (Abb. 5.18a und c). Die Prozentsätze in der *Gene Gun*-Gruppe waren etwa halb so hoch (4,6% \pm 2,6%). Die T-Helferantwort wurde durch die Stimulierung der Milzzellen mit LLO₁₉₀₋₂₀₁ untersucht. LLO₁₉₀₋₂₀₁ ist ein H-2^b-restringiertes Peptid von *LM*, welches von einer immunodominanten CD4-T-Zellpopulation erkannt wird. *Gene Gun*-vakzinierte Mäuse hatten im Vergleich zu HSV-OVA-immunisierten Tieren durchschnittlich etwa zwei- bis dreifach höhere Prozentsätze von antigenspezifischen CD4-T-Zellen, die TNF- α bzw. INF- γ produzierten (Abb. 5.18b und d).

Zusammengenommen zeigen diese Daten, daß die rHSV-1-Vakzine nicht nur eine vorübergehend sehr starke CTL-Expansion, sondern auch einen wirksamen Langzeitschutz gegen Infektion mit dem fakultativ intrazellulärem Bakterium *L. monocytogenes* induziert. Der generierte Immunschutz reicht aus, um auch gegen eine sehr hohe Infektionsdosis zu schützen. Die DNA *Gene Gun*-Immunsierung induziert eine wesentlich schwächere spezifische CTL-Antwort, die zwar dazu ausreicht, Mäuse vor einer geringen bis mittleren Listeriendosis zu schützen, jedoch weniger effizient zu einer Beseitigung der Bakterien nach einer Infektion beiträgt.

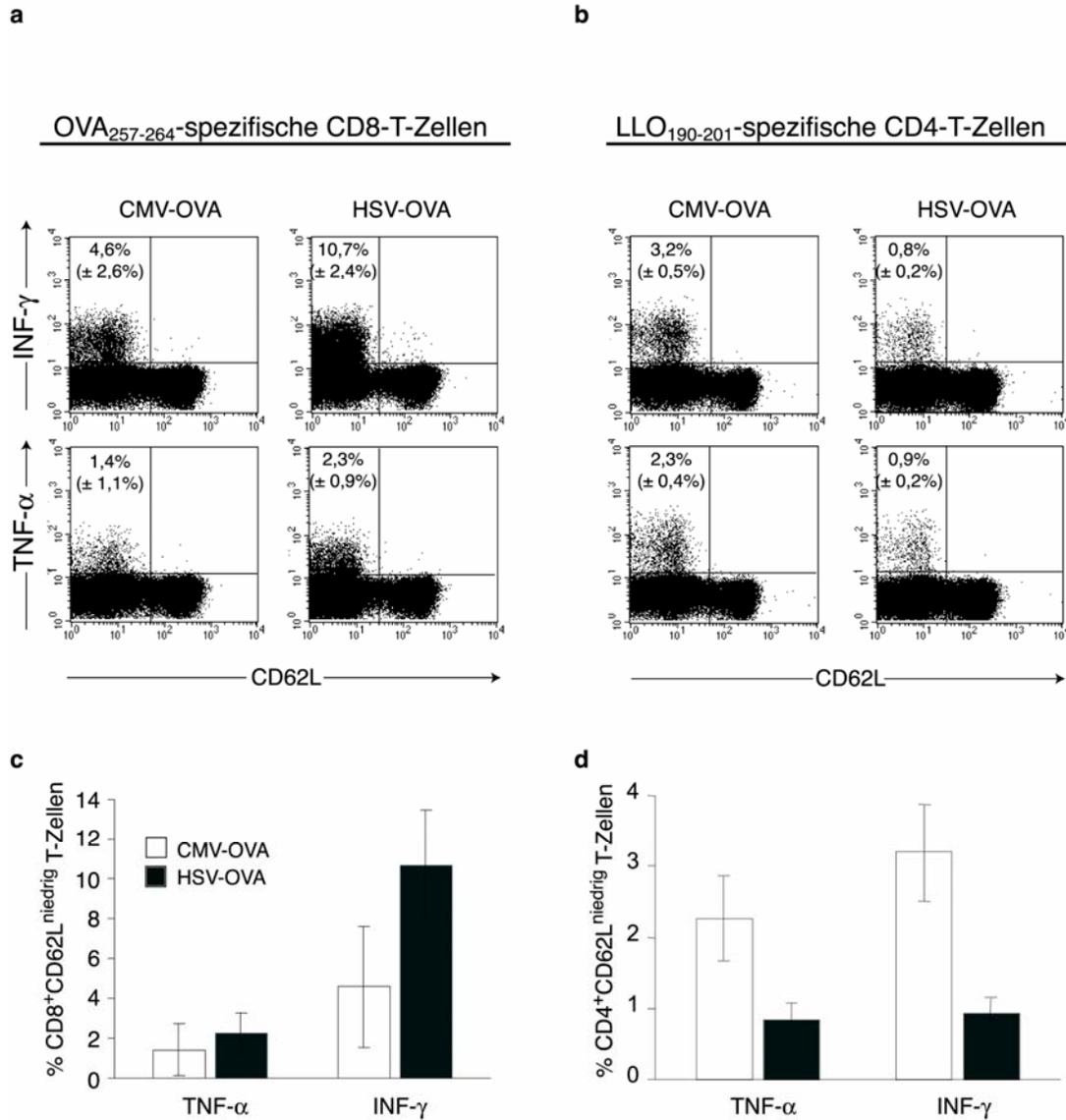


Abb. 5.18: Antigen-spezifische Zytokinproduktion von CD4- und CD8-T-Zellen. Milzzellen aus immunisierten Mäusen sieben Tage nach Infektion mit *LM*-OVA (s. Abb. 5.17) wurden entweder in Gegenwart von OVA₂₅₇₋₂₆₄ oder von LLO₁₉₀₋₂₀₁ für 5h inkubiert und anschließend für CD8 (a) bzw. CD4 (b) und CD62L auf der Zelloberfläche und für intrazelluläres TNF- α oder INF- γ gefärbt. In den *dot plots* ist jeweils der durchschnittliche Prozentsatz (\pm SD) von CD8- bzw. CD4-T-Zellen angegeben, die eine niedrige CD62L-Expression aufweisen und das jeweilige Zytokin produzieren. (c und d) Darstellung der jeweiligen Werte im Balkendiagramm (n=2-4 Mäuse/Gruppe).

5.4 Der Einfluß einer bestehenden antiviralen Immunantwort auf rHSV-1-Vakzinierung

5.4.1 HSV-1-Immunität vermindert die antigenspezifische CD8-T-Zellantwort

In den bisher beschriebenen Versuchen wurde eingehend die Immunantwort untersucht, die durch das transgene Modellantigen OVA induziert wurde. Im Fall der DNA-Immunsierung ist dies in der Regel das einzige Protein, welches nach erfolgter Transfektion eukaryotischer Zellen produziert wird. Da weder die Plasmid-DNA selbst noch die Goldpartikel immunogen sind, ist die durch die Vakzinierung induzierte Immunantwort ausschließlich gegen Ovalbumin gerichtet. Somit kann keine Immunität gegen den Impfstoff entstehen, und es können ohne Verminderung der Effektivität weitere Impfungen durchgeführt werden. Im Gegensatz zur Impfung mit purer DNA kann es bei der Verwendung virusbasierter Vakzine zu Immunantworten gegen die Virushülle kommen. Dadurch könnte die Wirkung einer wiederholten Impfung stark verringert werden. Dies wurde u.a. schon für Adenovirus- und Pockenvirus-Vektoren gezeigt (Cooney, E.L. *et al.*, 1993; Flexner, C. *et al.*, 1988; Hammond, S.A. *et al.*, 1992; Schulick, A.H. *et al.*, 1997). Im Hinblick auf die weltweite Verbreitung von HSV in der Bevölkerung, erscheint es sehr wichtig, die Effekte einer bereits existierenden Immunität auf HSV-basierende Impfstoffvektoren zu verstehen. Neuere Untersuchungen ergaben, daß 60%-95% der Bevölkerung seropositiv für HSV-1 ist (Cunningham, A.L., Mindel, A., Dwyer, D. E., 2000; Stanberry, L.R. *et al.*, 2000). Bisherige Studien beschränkten sich weitestgehend darauf, die Konsequenzen einer bestehenden HSV-Immunität auf die Wirkung von HSV-basierenden Gentherapie-Vektoren zu untersuchen (Chahlavi, A. *et al.*, 1999; Herrlinger, U. *et al.*, 1998). Kürzlich wurde berichtet, daß eine bestehende antivirale HSV-1-Immunität keinen negativen Einfluß auf die Effizienz einer HSV-abgeleiteten Vakzine hat, spezifische Antikörper gegen ein Transgen zu induzieren (Brockman, M.A. und D.M. Knipe, 2002). Da die Induktion einer starken CTL-Antwort allerdings gerade im Hinblick auf die Bekämpfung intrazellulärer Bakterien von großer Bedeutung ist, sollte vor allem der Effekt einer bestehenden HSV-Immunität auf diesen Teil der Immunantwort genauer betrachtet werden.

Zunächst wurde untersucht, inwieweit die Immunsierung von Mäusen mit HSV-OVA bzw. HSV-GFP zur Bildung von anti-HSV-1 Antikörpern führt. 17 und 38 Tage nach einer einmaligen intravenösen Immunsierung mit dem jeweiligen Vektor wurde der anti-HSV-1

Serumtiter bestimmt. Als Negativkontrolle diente die DNA-Immunsierung per *Gene Gun*. Dabei zeigte sich, daß beide rHSV-1 Vakzine die Bildung antiviraler IgM- und IgG-Antikörper induzierten (Abb. 5.19a und b). Die jeweiligen Titer nach 38 Tagen waren dabei nicht signifikant höher als nach 17 Tagen. Die Analyse von IgG-Isotypen ergab, daß sowohl Antikörper der Subklasse IgG1 als auch IgG2a gegen die Virushülle gebildet wurden (Abb. 5.19c und d). Die IgG2a-Titer waren dabei höher, als die IgG1-Titer, was auf eine T_H1 -gerichtete Immunantwort hinweist. Die Unterschiede zwischen HSV-OVA- und HSV-GFP-immunisierten Tieren waren in keinem Fall signifikant ($p > 0,05$).

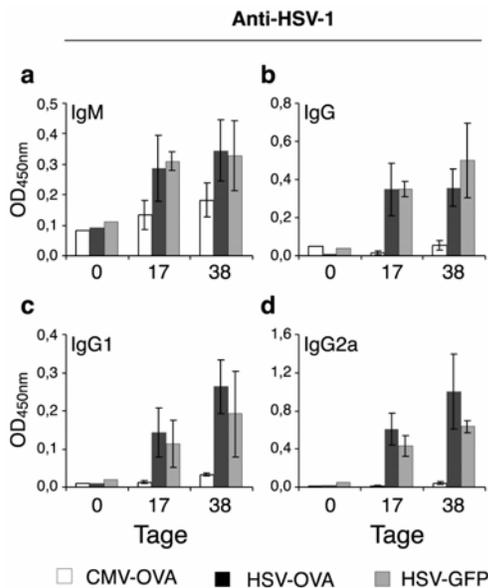


Abb. 5.19: HSV-1-spezifische Antikörper in rHSV-1-immunisierten Mäusen. BALB/c-Mäuse wurden mit CMV-OVA (*Gene Gun*), HSV-OVA oder HSV-GFP (jeweils 4×10^6 I.E./Maus, i.v.) immunisiert (Tag 0). An den angegebenen Tagen wurde den Mäusen Blut entnommen und Serum präpariert. Der Titer rHSV-1-spezifischer Antikörper wurde mittels ELISA aus Serum (1:50) bestimmt. Der Prä-Immunistatus (Tag 0) jeder Gruppe wurde mit einem Serungemisch der jeweiligen Tiere bestimmt. Als Sekundäntikörper wurden (a) anti-IgM, (b) anti-IgG, (c) anti-IgG1 oder (d) anti-IgG2a verwendet. Alle Serumproben wurden in Doppelansätzen getestet. Angegeben ist jeweils die durchschnittliche OD_{450nm} (\pm SD) ($n=3-4$ Mäuse/Gruppe).

Nachdem gezeigt wurde, daß eine Immunisierung mit HSV-GFP eine Immunreaktion gegen das rekombinante Virus induziert, wurden Mäuse mit diesem Vektor immunisiert. Zur Kontrolle wurde die Expansion OVA-spezifischer CD8-T-Zellen mittels Tetramerfärbungen gemessen. Wie erwartet kam es zu keiner Expansion der $CD8^+Tet^+$ T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Nach drei Wochen wurden die HSV-GFP-immunisierten Mäuse und naive Mäuse, die zuvor nicht immunisiert wurden, mit HSV-OVA vakziniert. Die Expansion der $CD8^+Tet^+$ T-Zellen wurde für weitere 17 Tage verfolgt. Wie in vorangegangenen Experimenten bereits gezeigt (Abb. 5.10 und 3.11), antworten naive Mäuse mit einer starken OVA-spezifischen CTL-Antwort auf die Impfung mit HSV-OVA (Abb. 5.20). Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse, die zuvor mit HSV-GFP immunisiert waren, eine extrem verringerte CTL-Expansion. In dieser Gruppe befanden sich 13 Tage nach der HSV-OVA-Impfung nur 0,76% (\pm 0,37%) $CD8^+Tet^+$ T-Zellen in $CD8^+$ PBL,

wohingegen der Prozentsatz der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen in zuvor HSV-seronegativen Tieren auf bis zu 5,53% (\pm 1,23%) von allen CD8⁺ PBL anstiegen. Dies bedeutet, daß eine bestehende HSV-1-Immunität, ausgelöst durch eine einzige intravenöse Injektion von rHSV-1, zu einer mehr als achtfach reduzierten CTL-Antwort führt.

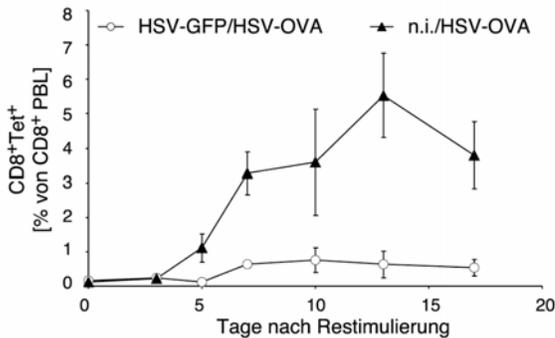


Abb. 5.20: Hemmung der antigen-spezifischen CD8-T-Zellexpansion. C57BL/6-Mäuse blieben nicht-immunisiert oder wurden mit HSV-GFP (4×10^6 I.E./Maus i.v.) vorimmunisiert. 21 Tage später wurden alle Mäuse mit HSV-OVA (4×10^6 I.E./Maus i.p.) immunisiert. PBL wurden mit anti-CD8 mAb und H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer gefärbt und per Durchflußzytometrie analysiert. Die Kinetik der Expansion ist als durchschnittlicher Prozentsatz (\pm SD) der CD8⁺Tet⁺ T-Zellen innerhalb der CD8⁺ PBL angegeben (n=5 Mäuse/Gruppe).

5.4.2 Bestehende antivirale Immunantwort vermindert CTL-Effektorfunktionen

Um den Einfluß einer bestehenden antiviralen Immunantwort auf die Effektivität der rekombinanten Vakzine HSV-OVA zu untersuchen, wurde das transgene RIP-OVA₁₀-Mausmodell verwendet. Da bereits gezeigt wurde, daß die Immunisierungsrouten einen großen Einfluß auf die antigenspezifische Immunantwort hat (Abb. 5.6, 3.13 und 3.14), konnte davon ausgegangen werden, daß dies auch auf die Immunantwort gegen den Virusvektor zutrifft. Um dies zu untersuchen, wurden OT-1-T-Zellen adoptiv in RIP-OVA₁₀-Mäuse transferiert, die anschließend über verschiedene Routen mit HSV-GFP immunisiert wurden. Nach 17 Tagen wurden die Serumlevel von anti-HSV-1 Antikörpern bestimmt. Alle Mäuse, die i.v., i.p. oder i.d. immunisiert worden waren, hatten IgG gegen HSV-1 gebildet (Abb. 5.21a). Der durchschnittliche IgG-Titer in s.k. immunisierten Tieren war dagegen nicht signifikant höher als in naiven Mäusen ($p > 0,05$). Lediglich die i.p. Immunisierung führte zu einem moderaten Level an IgG1 (Abb. 5.21b). Dagegen induzierten alle Routen bis auf s.k. ähnlich hohe IgG2a-Titer gegen HSV-1 (Abb. 5.21c). Diese Daten zeigen, daß i.v., i.p. und i.d.-Injektionen mit rHSV-1 eine T_H1-gerichtete Antikörperantwort gegen HSV-1 induzieren, während eine s.k.-Injektion nicht zu signifikanten anti-HSV Antikörpertitern führt.

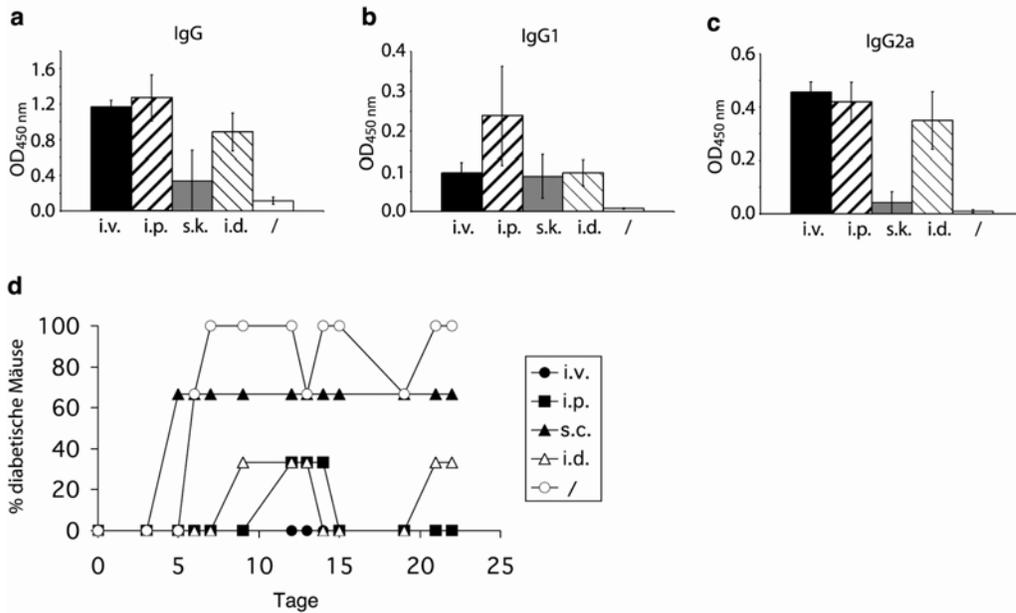


Abb. 5.21: Hemmung der CTL Effektorfunktion. RIP-OVA₁₀ Mäuse wurden über die angegebenen Routen mit HSV-GFP (4×10^6 I.E./Maus) immunisiert oder blieben nicht-immunisiert. Nach 17 Tagen wurden die HSV-1-spezifischen Antikörpertiter im Serum per ELISA bestimmt. Das Serum wurde in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden (a) anti-IgG, (b) anti-IgG1 oder (c) anti-IgG2a verwendet. Die Balkendiagramme zeigen die durchschnittliche OD_{450nm} (\pm SD) an. 19 Tage nach der Erstimmunisierung wurden alle Mäuse mit HSV-OVA (4×10^6 I.E./Maus i.v.) immunisiert. (d) Der Zuckergehalt im Urin wurde regelmäßig überprüft. Mäuse wurden für diabetisch befunden, wenn der Glukosegehalt mindestens 5,5 mM betrug (n=3 Mäuse/Gruppe).

19 Tage nach der Impfung mit HSV-GFP wurden alle Mäuse mit HSV-OVA immunisiert. Die Immunisierung mit HSV-OVA induzierte keinen Diabetes in i.v. vorimmunisierten Mäusen. In der i.p.-Gruppe zeigte eine Maus vorübergehend erhöhte Glukosewerte im Urin (Abb. 5.21d, Tag 12-14). In der Gruppe, in die HSV-GFP i.d. injiziert wurde, zeigte ebenfalls nur eine Maus vorübergehend erhöhte Glukosekonzentrationen (Abb. 5.21d, Tage 9-13 und 21-22). Nach fünf Tagen wurden zwei von drei Mäusen in der s.k.-Gruppe diabetisch und verblieben es bis zum Ende des Versuchs (Abb. 5.21d). In der nicht-vorimmunisierten, HSV-seronegativen Kontrollgruppe wurden alle Mäuse diabetisch. Zwei von ihnen zeigten konstant hohe Glukosekonzentrationen im Urin, während eine nur geringe bis moderate Konzentrationen aufwies.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß i.v., i.p. und i.d. Immunisierung mit rHSV-1 zu einer starken antiviralen Immunantwort führt, und daß die s.k. Injektionsroute zwei- bis vierfach geringere anti-HSV Antikörpertiter induziert. Desweiteren scheinen hohe anti-HSV-1 Antikörpertiter einen negativen Effekt auf die Effizienz einer zweiten Immunisierung mit einem homologen, rekombinanten HS-Virus zu haben. Sie führen

allerdings nicht zwangsläufig zu einer Neutralisierung der rHSV-1-Vakzine, da einzelne Tiere trotz hoher anti-HSV-1-Titer zeitweilig diabetisch wurden.

6 DISKUSSION

Für die Entwicklung eines Impfstoffs ist es von entscheidender Bedeutung, die durch ihn induzierte Immunantwort zu charakterisieren und gegebenenfalls zu optimieren. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse mit verschiedenen OVA-kodierenden Plasmidvektoren und rekombinanten Virusvektoren immunisiert und die humoralen und zellulären Immunantworten untersucht. Desweiteren wurde das Potential zweier Vakzine untersucht, Mäuse vor einer Infektion mit dem fakultativ intrazellulären Bakterium *L. monocytogenes* zu schützen.

6.1 Die Rolle der zellulären Lokalisierung des Antigens nach DNA-Immunisierung

Bedingt durch ihren einfachen Aufbau können DNA-Vakzine leicht verändert werden und eignen sich daher u.a. besonders zur Untersuchung verschiedener Antigenformen oder Promotoren. Mehrere Studien lassen darauf schließen, daß bei der DNA-Immunisierung die verwendete Methode bzw. die Injektionsroute, die zelluläre Lokalisierung des kodierten Antigens sowie die intrinsischen Eigenschaften des Antigens sowohl die Qualität als auch die Quantität der spezifischen Immunantwort maßgeblich beeinflussen (Boyle, J.S. *et al.*, 1997a; Boyle, J.S. *et al.*, 1997b; Drew, D.R. *et al.*, 2000; Rush, C. *et al.*, 2002; Torres, C.A. *et al.*, 1999; Ulmer, J.B. *et al.*, 1993).

Boyle *et al.* (Boyle, J.S. *et al.*, 1997a) und Rush *et al.* (Rush, C. *et al.*, 2002) konnten in ihren Studien die Bildung OVA-spezifischer Antikörper durch intramuskuläre DNA-Immunisierungen induzieren. Obwohl in der vorliegenden Arbeit ähnliche OVA-Konstrukte (CMV-OVA und CMV_{-m}OVA) verwendet wurden, konnte in mehreren unabhängigen Versuchen keine Antikörperantwort nach intramuskulärer Immunisierung gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Wurden dieselben Konstrukte allerdings per *Gene Gun* appliziert, kam es zu starken IgG-Antworten (Abb. 5.1). Diese Daten untermauern die Ergebnisse anderer Gruppen, in denen *Gene Gun*-Immunisierungen zu verlässlicheren Ergebnissen und mit geringeren DNA-Mengen zu stärkeren Immunantworten führten, als intramuskuläre Immunisierungen (Haynes, J.R. *et al.*, 1996; Torres, C.A. *et al.*, 1999; Yoshida, A. *et al.*, 2000). Die Expression eines Transgens nach intramuskulärer DNA-Immunisierung hängt von äußeren Faktoren wie beispielsweise der

Injektionsgeschwindigkeit, dem Lösungsmittel oder dem physiologischen Zustand des Muskels ab (Wolff, J.A. *et al.*, 1991) und variiert deutlich zwischen einzelnen Mäusen (Tokui, M. *et al.*, 1997; Yoshida, A. *et al.*, 2000). Da transfizierte Myozyten selbst nicht in der Lage sind, CTL-Antworten zu induzieren, erfolgt dies durch Kreuzpräsentation des Antigens auf DCs (Corr, M. *et al.*, 1996; Corr, M. *et al.*, 1999; Fu, T.M. *et al.*, 1997; Ulmer, J.B. *et al.*, 1996). Bei der *Gene Gun*-Immunisierung wird dagegen eine konstante Menge Plasmid-DNA unter konstanten Bedingungen direkt in die Epidermis injiziert. Dabei werden u.a. Langerhanszellen transfiziert, deren wichtige Rolle für die Auslösung einer Immunantwort nach einer *Gene Gun*-Immunisierung mehrfach bestätigt werden konnte (Akbari, O. *et al.*, 1999; Casares, S. *et al.*, 1997; Condon, C. *et al.*, 1996; Klinman, D.M. *et al.*, 1998; Porgador, A. *et al.*, 1998; Torres, C.A. *et al.*, 1997). Laut einer neueren Studie sind Langerhanszellen im Falle einer viralen Infektion allerdings nicht für die direkte T-Zellstimulation verantwortlich, sondern übertragen das Antigen vermutlich im Lymphknoten auf CD8 α^+ DCs (Allan, R.S. *et al.*, 2003). Die Details dieses Transfers und die genaue Rolle von Langerhanszellen in verschiedenen Immunisierungs- und Infektionsmodellen ist jedoch noch ungeklärt.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen relativen Unterschiede in der Höhe der OVA-spezifischen IgG-Titer nach Immunisierung mit den verschiedenen OVA-Konstrukten (Abb. 5.1) fallen ähnlich aus, wie in den Studien von Boyle *et al.* (Boyle, J.S. *et al.*, 1997a) und Rush *et al.* (Rush, C. *et al.*, 2002). Sezerniertes OVA führt unabhängig von dem Promotor (CMV oder CD11c, in der vorliegenden Arbeit) und der Injektionsroute (i.m. (Boyle, J.S. *et al.*, 1997a; Rush, C. *et al.*, 2002), i.d. (Boyle, J.S. *et al.*, 1997a) oder *Gene Gun* (in der vorliegenden Arbeit)) zu höheren IgG-Titern als membrangebundenes OVA. Dieser Effekt hängt vermutlich mit der besseren Antigenverfügbarkeit für die Stimulation von B-Zellen zusammen. Boyle *et al.* konnten zwar zeigen, daß die Antikörperantwort abhängig von CD4-T-Zellen war, wiesen aber nach, daß die T-Zellhilfe nicht der limitierende Faktor war (Boyle, J.S. *et al.*, 1997a). Ein lösliches Antigen kann demnach im Lymphknoten effizienter zur Aktivierung von B- und CD4-T-Zellen und damit zu höheren Antikörpertitern führen.

Während nach intramuskulärer und intradermaler Immunisierung auch Unterschiede in den generierten IgG-Isotypen festgestellt wurden (Boyle, J.S. *et al.*, 1997a; Rush, C. *et al.*, 2002), führte die *Gene Gun*-Immunisierung unabhängig von der Antigenlokalisierung zu einer IgG1-dominierten Antwort (Abb. 5.1). Dies war erwartet worden, da *Gene Gun*-Immunisierungen vorwiegend zu T_H2-Antworten und damit zur Bildung von IgG1-

Antikörpern führen (Feltquate, D.M. *et al.*, 1997; Pertmer, T.M. *et al.*, 1996; Torres, C.A. *et al.*, 1999; Weiss, R. *et al.*, 2002). Dieser qualitative Unterschied läßt sich zum einen dadurch erklären, daß bei der *Gene Gun*-Immunisierung die DNA direkt in die Zelle transferiert wird. Dadurch wird die endosomale Aufnahme, wie sie im Fall von löslicher DNA vorkommt, umgangen, und es kann vermutlich nicht zu einer Bindung der CpG-Motive an den TLR9 kommen, da der Kontakt zwischen DNA und dem TLR9 in den gereiften Endosomen stattfindet (Latz, E. *et al.*, 2004). Insofern kommt es nicht, wie im Fall der intramuskulären Immunisierung, zu einer Synthese der T_H1-assoziierten Zytokine (Hemmi, H. *et al.*, 2000; Klinman, D.M. *et al.*, 1996). Weiss *et al.* haben zudem postuliert, daß der physikalische Reiz durch die eindringenden Goldpartikel ein „Gefahrsignal“ darstellt, welches die T_H1-begünstigende Wirkung der CpG-Motive überdeckt, so daß eine *Gene Gun*-Immunisierung auch trotz koinjizierter CpG-Motive eine T_H2-Antwort induziert (Weiss, R. *et al.*, 2002). Zum anderen konnte kürzlich gezeigt werden, daß CpG-Motive direkt über TLR9 auf B-Zellen wirken und dadurch die Produktion von IgG1 und IgE inhibieren und die Synthese von IgG2a induzieren (Krieg, A.M. *et al.*, 1995; Liu, N. *et al.*, 2003). Dies kann im Fall der *Gene Gun*-Immunisierung ebenfalls nicht stattfinden. Da für eine intramuskuläre DNA-Immunisierung außerdem etwa 50-500mal mehr DNA benötigt wird als für eine *Gene Gun*-Immunisierung (Fynan, E.F. *et al.*, 1993; Haynes, J.R. *et al.*, 1996), befinden sich demnach auch weniger CpG-Motive in einer *Gene Gun*-Impfdosis. Die bessere Effizienz der *Gene Gun*-Immunisierung (Haynes, J.R. *et al.*, 1996; Torres, C.A. *et al.*, 1999; Yoshida, A. *et al.*, 2000) könnte auch mit einer stärkeren Antigenproduktion zusammenhängen. Hohe Antigen Dosen wiederum führen nach dem Modell von Thompson zu einer T_H2-Antwort und niedrige Dosen zu einer T_H1-Antwort (Thompson, C.B., 1995). Die OVA-spezifischen IgG-Titer waren niedriger, wenn die Expression des Transgens anstatt unter der Kontrolle des CMV-Promotors unter der Kontrolle des CD11c-Promotors stand (Abb. 5.1). Dies kann zum einen durch die relative Stärke als auch durch die zelluläre Spezifität der beiden Promotoren erklärt werden. Während der CMV-Promotor ubiquitär aktiv ist und als starker Promotor gilt, ist der CD11c-Promotor DC-spezifisch und gilt als relativ schwach. Die Transgenexpression unter der Kontrolle des CD11c-Promotors führt demnach zu einer effektiv niedrigeren Antigen dosis. Um den Einfluß der Promotorstärke zu quantifizieren, müßten allerdings Genexpressionsstudien mit den verwendeten Konstrukten durchgeführt werden. Durch die DC-spezifische Aktivität können Keratinozyten und andere somatische Zellen nicht als Antigenreservoir dienen, wenn sie mit einem CD11c-Konstrukt transfiziert wurden. In diesem Fall können sie nicht, wie beschrieben, daß Ausmaß und die

Dauer der Immunantwort beeinflussen (Akbari, O. *et al.*, 1999; Klinman, D.M. *et al.*, 1998).

Als nächstes wurde die Fähigkeit der verschiedenen OVA-Konstrukte untersucht, eine CD4-T-Zellantwort zu induzieren. Die Immunisierung mit den Konstrukten CMV-OVA und CD11c-OVA führte in beiden Fällen zu einer deutlichen Expansion der adoptiv transferierten DO11.10-T-Zellen (Abb. 5.2). Sowohl die Frequenz als auch die absolute Zellzahl der DO11.10-Zellen war in den Lymphknoten CMV-OVA-immunisierter Mäuse allerdings mehrfach höher. Diese Differenz läßt sich wie zuvor bei der Antikörperantwort ebenfalls durch die unterschiedliche Promotorstärke erklären. In CMV-OVA-immunisierten Tieren wird mehr OVA produziert und sezerniert. Somit kann mehr Antigen von APCs aufgenommen, prozessiert und über MHC-II-Moleküle präsentiert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen aus mehreren Studien überein, in denen nachgewiesen wurde, daß die Menge der produzierten Effektor-T-Zellen umso größer ist, je mehr Antigen verfügbar ist (Kaech, S.M. und R. Ahmed, 2001; Kedl, R.M. *et al.*, 2000; Ludewig, B. *et al.*, 1998; Mercado, R. *et al.*, 2000). Creusot *et al.* haben ebenfalls die Entwicklung von DO11.10-Zellen nach *Gene Gun*-Immunisierung mit einem OVA-Konstrukt untersucht (Creusot, R.J. *et al.*, 2001). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Frequenzen und Expansionskinetiken nach CMV-OVA-Immunisierung entsprechen in etwa den Ergebnissen aus dieser Studie. Creusot *et al.* beschränkten sich allerdings auf den Vergleich von Protein/CFA-Immunisierung und CMV-OVA-Immunisierung per *Gene Gun*. Rush *et al.* konnten zwar nach intramuskulärer DNA-Immunisierung Teilungen von CFSE-markierten DO11.10-Zellen beobachten, fanden aber keine Erhöhung der Frequenz oder der Zellzahl (Rush, C. *et al.*, 2002). Sie beobachteten eine Zunahme der Zellteilungen, wenn das Antigen sezerniert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluß der Antigenlokalisierung nach *Gene Gun*-Immunisierung auf CD4-T-Zellen *in vivo* untersucht. Die Zellzahl der DO11.10-Zellen fünf Tage nach Immunisierung mit CMV-OVA war etwa doppelt so hoch, wie nach Immunisierung mit CMV_mOVA (Abb. 5.3b). Dies bestätigt die Vermutung von Rush *et al.* (Rush, C. *et al.*, 2002), daß die Antigensekretion die Expansion von CD4-T-Zellen begünstigt. In der Frequenz und der CD44-Expression konnten jedoch keine Unterschiede zwischen CMV-OVA- und CMV_mOVA-immunisierten Mäusen festgestellt werden (Abb. 5.3a und d). Dies bedeutet, daß beide Konstrukte in der Lage sind, die Aktivierung von DO11.10-Zellen zu induzieren. Die membranständige OVA-Form führt zwar zu einer prozentualen Zunahme der DO11.10 Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation, vermag aber nicht eine ebenso

große Zunahme der gesamten Populationsgröße zu induzieren, wie die sezernierte Form. So ist es möglich, daß sezerniertes OVA zu einer stärkeren Expansion der DO11.10-Zellen führt als m OVA, daß aber ebenso mehr DO11.10-negative Lymphozyten durch sezerniertes OVA zur Teilung angeregt werden. Die höheren IgG-Titer nach CMV-OVA-Immunisierung legen den Schluß nahe, daß sezerniertes OVA zu einer stärkeren B-Zellproliferation führt und damit zu einer insgesamt größeren Lymphozytenpopulation in den drainierenden Lymphknoten. Um diese Vermutung zu belegen, müßte jedoch eine genaue Analyse der Lymphozytenpopulation durchgeführt werden.

Es konnte keine signifikante und reproduzierbare Erhöhung des Prozentsatzes von DO11.10-Zellen in den drainierenden Lymphknoten nach einer einmaligen Immunisierung mit CD11c-Konstrukten demonstriert werden (Abb. 5.3). In einzelnen Mäusen konnten dennoch leicht erhöhte Frequenzen gemessen werden. Da durchschnittlich etwa 50-80% der DO11.10-Zellen eine erhöhte CD44-Expression aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, daß sie durch die einmalige Immunisierung aktiviert wurden. Verantwortlich für das Ausbleiben einer signifikanten Proliferation der transgenen CD4-T-Zellen ist die geringe Antigenmenge, die durch die einmalige Immunisierung mit CD11c-Konstrukten zur Verfügung stand. Wurde die zur Verfügung stehende Antigenmenge erhöht, entweder durch den stärkeren CMV-Promotor oder durch eine zweite Immunisierung (Abb. 5.2), konnte die klonale Expansion der DO11.10-Zellen beobachtet werden. Es gibt demnach einen Schwellenwert für die Antigenkonzentration, der erreicht werden muß, um CD4-T-Zellen zu einer Expansion anzuregen. Dies entspricht den Beobachtungen von Rush *et al.*, die durch intramuskuläre Immunisierungen keine CD4-T-Zellexpansion induzieren konnten (Rush, C. *et al.*, 2002). Durch CFSE-Markierung konnten sie allerdings eine Teilung der DO11.10-Zellen nachweisen. Dieser Test ist sensitiver als eine Antikörpermarkierung und könnte auch Aufschluß darüber bringen, ob die einmalige *Gene Gun*-Immunisierung mit einem CD11c-OVA-Konstrukt ausreichend ist, eine Teilung der DO11.10-Zellen zu induzieren. Ulmer *et al.* stellten ebenso fest, daß eine *in vitro* gemessene CD4-Antwort am stärksten ausfiel, wenn eine hohe DNA-Immunisierungsdosis angewendet wurde (Rogers, P.R. und M. Croft, 1999; Ulmer, J.B. *et al.*, 1998).

Kaech und Ahmed haben berichtet, daß selbst sehr geringe Antigenmengen ausreichen, um die Teilung und Differenzierung von CD8-Zellen zu induzieren (Kaech, S.M. und R. Ahmed, 2001). In mehreren Studien konnten CTL-Antworten gegen Antigene verschiedener Pathogene nach intramuskulären Immunisierungen nachgewiesen werden (Boyle, J.S. *et al.*, 1997a; Boyle, J.S. *et al.*, 1997b; Fu, T.M. *et al.*, 1999; Pertmer, T.M. *et al.*, 1996; Ulmer, J.B. *et al.*, 1994; Ulmer, J.B. *et al.*, 1993; Yoshida, A. *et al.*, 2000).

Gemessen wurden die CTL-Antworten allerdings *in vitro*, so daß nur bedingt Aussagen darüber getroffen werden können, wie sich die antigenspezifischen CD8-T-Zellen in ihrer natürlichen Umgebung im intakten Organismus verhalten. Durch die Verwendung TCR-transgener CD8-T-Zellen war es in der vorliegenden Arbeit möglich, den Verlauf der CD8-Antwort *in vivo* zu verfolgen. So konnte, ähnlich wie für die CD4-Antwort, gezeigt werden, daß eine *Gene Gun*-Immunisierung nicht ausreicht, eine CD8-T-Zellexpansion zu induzieren, wenn die Antigenexpression unter der Kontrolle des CD11c-Promotors steht (Abb. 5.4). Etwa 50% der OT-1-Zellen zeigten allerdings einen aktivierten Phänotyp (CD44^{hoch}, Abb. 5.4d). In einem *ex vivo*-System hätten vermutlich zytotoxische Effektorfunktionen und/oder Zytokinproduktionen nachgewiesen werden können. Diese Hypothese ließe sich jedoch nur durch entsprechende Versuche bestätigen. Stand die Antigenexpression unter der Kontrolle des stärkeren CMV-Promotors, reichte eine einmalige *Gene Gun*-Immunisierung aus, um eine starke Expansion der OT-1-Zellen zu induzieren. Im Gegensatz zur CD4-T-Zellantwort fiel die Expansion der CD8-T-Zellen stärker aus, wenn das Antigen membrangebunden war. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Einen ähnlichen Effekt konnten auch Rush *et al.* nach intramuskulärer Immunisierung demonstrieren (Rush, C. *et al.*, 2002). Während sezerniertes Antigen durch Mikropinozytose von APCs aufgenommen werden kann, werden zellassozierte Antigene durch Phagozytose von nekrotischen Zellen (z.B. transfizierte Keratinozyten) oder im Komplex mit Chaperonen aufgenommen (Kumaraguru, U. *et al.*, 2000). Werden diese exogenen Antigene auf MHC-I-Molekülen präsentiert, spricht man von Kreuzpräsentation. Von Cho *et al.* wurde postuliert, daß dieser Mechanismus im Falle der *Gene Gun*-Immunisierung für die Induktion der CD8-Antwort verantwortlich ist (Cho, J.H. *et al.*, 2001). Eine Studie zur Kreuzpräsentation, bei der ebenfalls OT-1-Zellen verwendet wurden, hat gezeigt daß zellassoziertes OVA sehr viel effizienter präsentiert wird, als lösliches OVA (Li, M. *et al.*, 2001).

Die *in vivo* gewonnenen Daten aus der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, daß sezerniertes OVA nach einer DNA-Immunisierung zwar auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden kann, daß diese (Kreuz)-Präsentation allerdings weniger effizient ist, als die von zellassoziertem OVA. Sezerniertes OVA wird dagegen besser über den MHC-II-Prozessierungsweg präsentiert und führt zu einer stärkeren CD4-T-Zell- und B-Zellantwort. Die Unterschiede in den verschiedenen untersuchten Immunantworten waren zwar meistens signifikant, aber eher marginal, so daß unabhängig von der Antigenform die DNA-Immunisierung per *Gene Gun* eine zuverlässige und einfach anzuwendende Methode darstellt, um sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten zu induzieren.

6.2 Die Immunantwort auf Immunisierung mit rHSV-1

Es konnte nachgewiesen werden, daß durch eine Immunisierung mit dem replikationsdefekten HSV-OVA-Vektor eine OVA-spezifische Antikörperantwort induziert werden konnte, und daß diese Antwort von der Injektionsroute des Vektors abhing (Abb. 5.5 und 3.6). Im direkten Vergleich mit *Gene Gun*-immunisierten Mäusen waren die IgG-Titer in HSV-OVA-immunisierten Mäusen deutlich geringer (Abb. 5.5). Entsprechend anderen Studien mit replikationsdefekten HSV-1-Vektoren (Brubaker, J.O. *et al.*, 1996; Gyotoku, T. *et al.*, 2002) läßt sich die Tendenz zu einer verstärkten Produktion von IgG2a und damit zu einer T_H1-gerichteten Immunantwort erkennen. Ein exakter Vergleich der beiden Isotypen ist nicht möglich, da die ELISAs nicht standardisiert waren. Desweiteren lassen sich nur bedingt Rückschlüsse von dem IgG-Isotyp auf den Typ der T-Helferzellantwort ziehen, ohne die Zytokinproduktion zu untersuchen (Lewis, P.J. *et al.*, 1999). Verantwortlich für die T_H1-gerichtete Immunantwort nach einer Immunisierung mit viralen Vektoren scheinen die IL-12- und INF- γ -Produktion von infizierten Makrophagen und Lymphknotenzellen zu sein (Brubaker, J.O. *et al.*, 1996; Coutelier, J.P. *et al.*, 1995). Die direkte Wirkung von HSV-DNA auf TLR9 konnte ebenfalls kürzlich nachgewiesen werden (Krug, A. *et al.*, 2004; Lund, J. *et al.*, 2003). Das unterschiedliche Ausmaß der Antikörperantwort nach Immunisierung über verschiedene Routen läßt sich vermutlich auf die unterschiedlichen Zelltypen zurückführen, die durch den Vektor transfiziert wurden. Die starke IgG-Antwort nach intradermaler Injektion deutet auf eine Transfektion der in der Haut ansässigen professionellen APCs (Makrophagen und Langerhanszellen) hin. Ähnliche Beobachtungen machten auch Hocknell *et al.* mit HSV-1-Amplikons (Hocknell, P.K. *et al.*, 2002). Allerdings konnten sie die höchsten IgG-Titer nach intraperitonealer Immunisierung messen, wohingegen diese Route in der vorliegenden Arbeit zwar zu keiner OVA-spezifischen IgG-Antwort, aber zu der stärksten CD8-T-Zellexpansion geführt hat. Brubaker *et al.* konnten ebenfalls keine antigenspezifischen IgG-Titer nach einer einmaligen intraperitonealen Immunisierung mit einem replikationsdefekten HSV-1-Vektor messen (Brubaker, J.O. *et al.*, 1996). Verantwortlich für diese Unterschiede könnten die Eigenschaften der Vektoren (z.B. Zelltropismus, Induktion von Zytokinen) oder die der Antigene (HIV gp120, β gal und OVA) sein. Eine Immunisierung über die Haut (topisch) oder die Schleimhaut (i.n.) scheint mit HSV-OVA nicht möglich zu sein. Offensichtlich werden bedingt durch die Barrierefunktion nicht genügend Zellen transduziert, um eine Immunantwort zu induzieren.

Die IgG-Antwort nach Immunisierung mit HSV-OVA fiel zwar sehr viel geringer aus, als nach *Gene Gun*-Immunisierung, war aber immer noch deutlich messbar. Mit dem System des adoptiven CD4-T-Zelltransfers konnte jedoch keine OVA-spezifische CD4-Antwort in den Lymphknoten gemessen werden (Abb. 5.7). Diese Beobachtung war unabhängig von der Injektionsroute des rekombinanten Virus, und durch die Untersuchung von Milz und mesenterialen Lymphknoten konnte weiterhin ausgeschlossen werden, daß sich vermeintlich expandierte DO11.10-Zellen in anderen peripheren lymphatischen Organen aufhalten. Lediglich sieben Tage nach Immunisierung konnte in einem Experiment eine schwache, aber signifikante Zunahme von DO11.10-Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis muß jedoch noch durch weitere Experimente bestätigt werden.

Die mit dem angewendetem System nicht messbare CD4-T-Zellantwort ist vermutlich der Grund für die schwache OVA-spezifische Antikörperantwort. Es ist unwahrscheinlich, daß die Glykoproteine E (gE) und I (gI) aus der Virushülle, die den Fc-Teil von IgG binden (Dowler, K.W. und R.W. Veltri, 1984), OVA-spezifische Antikörper maskieren, da MHC-II-assoziierte Peptide von OVA auch von nicht-transfizierten APCs präsentiert werden können. Weshalb trotz des sezernierten Antigens keine oder nur eine sehr schwache CD4-Antwort induziert werden konnte, bleibt unklar. Bisher ist keine Untersuchung veröffentlicht, in der speziell die CD4-T-Zellantwort auf eine Immunisierung mit einer rekombinanten HSV-1-Mutante untersucht wurde. Ebenso ist auch keine Funktion von HSV-Proteinen bekannt, die einen negativen Einfluß auf den MHC-II-Prozessierungsweg haben. Lediglich in einer Studie konnte ein hemmender Effekt auf die Fähigkeit lymphoblastischer B-Zelllinien, CD4-T-Zellen zu aktivieren, nachgewiesen werden (Barcy, S. und L. Corey, 2001). Diese Hemmung wurde allerdings auf die Wirkung des ICP22 zurückgeführt, dessen Gen, *US1*, in HSV-OVA deletiert ist. CD4-T-Zellen benötigen zur Induktion ihrer Differenzierung einen längeren Antigenstimulus als CD8-T-Zellen und weisen eine langsamere Zellteilungsrate auf (Gett, A.V. und P.D. Hodgkin, 2000; Iezzi, G. *et al.*, 1998; Jelley-Gibbs, D.M. *et al.*, 2000). Offensichtlich reicht die sezernierte OVA-Menge nach Immunisierung mit HSV-OVA nicht aus, um den Schwellenwert für das Antigen zu erreichen, der für eine CD4-Antwort nötig ist. Durch die starke und schnelle OVA-spezifische CTL-Antwort nach Immunisierung mit HSV-OVA (Abb. 5.10) ist es möglich, daß die transfizierten und OVA-produzierenden Zellen so schnell abgetötet werden, daß nicht mehr genug OVA produziert werden kann. Die CTL-Antwort nach *Gene Gun*-Immunisierung ist schwächer und langsamer (Abb. 5.8 und 3.10), so daß in diesem Fall genug Antigen für die CD4-Antwort produziert werden kann. Zudem wurde berichtet, daß in HSV-1-Mutanten, die keine IE-Gene exprimieren und dadurch in einen latenz-

ähnlichen Zustand eintreten, eine generelle Repression der Transkription stattfindet (Übersichtsartikel: Latchman, D.S., 2001). Diese Repression wirkt sich auch auf den hCMV-Promotor aus, so daß das Transgen nur für ein bis zwei Tage exprimiert wird (Preston, C.M. und M.J. Nicholl, 1997). Dieser Effekt könnte ebenfalls für die unzureichende OVA-Menge verantwortlich sein. Es gibt aber auch Studien mit einer ähnlichen HSV-1-Mutante, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, in denen eine 21 Tage lange Transgenexpression in Neuronen nachgewiesen wurde (Krisky, D.M. *et al.*, 1998). Insofern müßte eine Genexpressionsstudie mit HSV-OVA durchgeführt werden, um die Dauer der OVA-Expression in verschiedenen Zelltypen zu bestimmen. Außerdem kann mit den bisher durchgeführten Experimenten nicht ausgeschlossen werden, daß die CD4-T-Zellexpansion nach HSV-OVA-Immunisierung einer anderen Kinetik unterliegt und die Expansion zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet.

Im Gegensatz zu den CD4-positiven DO11.10-Zellen expandierten die adoptiv transferierten CD8⁺ OT-1-Zellen nach einer Immunisierung mit HSV-OVA schneller und stärker als nach einer *Gene Gun*-Immunisierung (Abb. 5.8). Das Ausmaß einer CD8-T-Zellexpansion korreliert positiv mit der vorhandenen Antigenmenge, d.h., daß umso mehr Effektorzellen produziert werden, je mehr Antigen verfügbar ist (Kaech, S.M. und R. Ahmed, 2001; Kedl, R.M. *et al.*, 2000; Ludewig, B. *et al.*, 1998; Mercado, R. *et al.*, 2000). Demnach führt eine Immunisierung mit HSV-OVA und AMP-OVA zu einer schnellen und starken OVA-Produktion. Da CD8-T-Zellen nur eine relativ kurze Stimulierung durch APCs benötigen, hätte es keinen Einfluß auf ihre Expansion, wenn die Antigenexpression bereits nach ein bis zwei Tagen wieder beendet wäre. Eine Dosisabhängigkeit der OT-1-Expansion konnte zudem durch Titrationsversuche mit HSV-OVA demonstriert werden. Es wurde festgestellt, daß mindestens 4×10^5 I.E. HSV-OVA injiziert werden müssen, um eine signifikante OT-1-Expansion zu induzieren (Daten nicht gezeigt). Diese Dosis führte zu einer deutlich geringeren Expansion als die Immunisierung mit 4×10^6 I.E. und induzierte nur in 50% der RIP-OVA₁₀-Mäuse eine OVA-spezifische CTL-Antwort (Abb. 5.9).

Die Verwendung der MHC-I-Tetramere erlaubte die Messung der *in vivo* vorkommenden CD8-T-Zellantwort, ohne die künstliche Erhöhung der Anzahl antigenspezifischer CD8-T-Zellen durch adoptiven Transfer TCR-transgener T-Zellen. Dabei wurde deutlich, daß der antigene Stimulus, der nötig ist, um die Expansion adoptiv transferierter OT-1-Zellen zu induzieren, schwächer sein kann, als für *in vivo* vorkommende OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifische CD8-T-Zellen. Während die *Gene Gun*-Immunisierung zwar eine zeitlich verschobene,

aber fast ebenso starke OT-1-Expansion induzierte wie die HSV-OVA-Immunisierung (Abb. 5.8), konnte nur eine sehr schwache Expansion der Tetramer-positiven CD8-T-Zellen nach *Gene Gun*-Immunisierung gemessen werden (Abb. 5.10c). Dies bedeutet, daß die Analyse mit MHC-I-Tetrameren physiologisch relevantere Informationen über das Ausmaß und die Kinetik einer CD8-T-Zellantwort liefert. Da zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit keine MHC-II-Tetramere erhältlich waren, mußte darauf verzichtet werden, auch die CD4-T-Zellantwort mit dieser Technik zu analysieren.

Die Kinetiken der CD8-T-Zellexpansionen nach Immunisierung mit HSV-OVA und MVA-OVA unterschieden sich nur marginal. Dabei wurde deutlich, daß durch die jeweiligen Immunisierung das Maximum einer polyklonalen CD8-T-Zellexpansion erreicht wurde. Auch durch eine zehnfache Steigerung der MVA-Dosis wurden keine signifikant höheren Frequenzen der Tetramer-positiven Zellen erreicht. Während HSV-OVA und MVA-OVA jeweils nur eine CMV- β Globin-OVA-Expressionskassette pro Virion enthalten, enthalten die Amplikons etwa 15 Kopien der Kassette, da das ca. 10 kb große Amplikonplasmid als ein 152 kb großes Concatemer in ein Virupartikel verpackt wird. Trotz der anzunehmenden stärkeren Antigenexpression nach Immunisierung mit AMP-OVA verlief die Expansion OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CD8-T-Zellen langsamer als nach Immunisierung mit HSV-OVA oder MVA-OVA (Abb. 5.10b und c und 3.11). Da sich die Virushüllen von HSV-OVA und AMP-OVA kaum unterscheiden, sollten beide Vektoren eine ähnlich inflammatorische Antwort des angeborenen Immunsystems hervorrufen. Insofern ist es unwahrscheinlich, daß die Expansionsunterschiede auf ein unterschiedliches Zytokinmilieu zurückzuführen sind. Dies zeigt sich auch in dem identischen Verlauf der OVA-unspezifischen CD8-Antwort (Abb. 5.10d und 3.11d). Demnach muß die unterschiedliche Expansionskinetik der Tetramer-positiven Zellen durch Unterschiede in der Antigenexpression bedingt sein. Dem Expansionsverlauf in Abb. 5.11a zufolge und der Tatsache, daß das Ausmaß einer T-Zellantwort von der verfügbaren Antigenmenge abhängt (Kaech, S.M. und R. Ahmed, 2001; Kedl, R.M. *et al.*, 2000; Ludewig, B. *et al.*, 1998; Mercado, R. *et al.*, 2000), wird das Antigen nach Immunisierung mit AMP-OVA vermutlich später und stärker exprimiert als nach Immunisierung mit HSV-OVA, so daß das im Durchschnitt etwa viermal höhere Maximum sechs Tage später erreicht wird. Der Grund für die verspätete Expression könnten die in den Amplikons fehlenden viralen Sequenzen und/oder unterschiedliche Proteinzusammensetzungen der Virionen sein. Proteine des Teguments und des Kapsids von HSV-1 haben verschiedene Funktionen im frühen Stadium der Infektion einer Zelle (Übersichtsartikel: Roizman, B., 1996). Von

einigen dieser Proteine ist bekannt, daß sie eine Rolle bei dem Transport des viralen Genoms durch das Zytoplasma in den Zellkern spielen (Donnelly, M. und G. Elliott, 2001; Morrison, E.E. *et al.*, 1998; Ye, G.J. *et al.*, 2000). Die genauen Mechanismen dieses Transports sind allerdings nicht bekannt. Es wäre demnach möglich, daß das Amplikongenom nicht genauso schnell in den Zellkern transportiert werden kann, wie das Genom von HSV-OVA, da dem Amplikon virale DNA-Sequenzen fehlen, mit denen die Transportproteine interagieren könnten. Entsprechendes gilt auch für andere Virionproteine, die als Transkriptionsaktivatoren der IE-Gene von HSV fungieren oder die virale DNA-Organisation modulieren (Dent, C.L. *et al.*, 1990; Herrlinger, U. *et al.*, 2000; van Leeuwen, H. *et al.*, 2003). Das *virion host shutoff* (vhs)-Protein ist Bestandteil des HSV-1-Teguments und führt zu einem schnellen Abbau viraler und zellulärer mRNA (Elgadi, M.M. *et al.*, 1999; Matis, J. und M. Kudelova, 2001). Da das Gen für vhs (*UL41*) in HSV-OVA nicht aber in den Helferviren (LaLAJ) bei der Amplikonproduktion deletiert ist, befindet es sich nur im Tegument der Amplikons. Im Falle einer Amplikoninfektion kann demnach das vhs-Protein die mRNAs abbauen und dadurch zu einer Verzögerung der OVA-Expression führen. Krisky *et al.* haben zudem gezeigt, daß es trotz der Deletion der IE-Gene für ICP4, 27 und 22 zu einer Hintergrundexpression von *ICP0* kommt (Krisky, D.M. *et al.*, 1998). Die Expression hält für einige Tage nach Transfektion an und könnte zu einer Blockade der DNA-Synthese und Zellteilung führen. Die transfizierte Zelle wäre dadurch in dieser Zeit vor zytotoxischen Angriffen des Immunsystems geschützt. Mit Amplikons transfizierte Zellen hätten diesen Schutzmechanismus nicht. Da jedoch nur ein kleiner Teil der Funktionen der über 80 Proteine und der nicht-kodierenden Sequenzen von HSV-1 bekannt ist, gibt es sicherlich noch mehrere Faktoren, die die Expression eines Transgens beeinflussen. Dementsprechend bleibt auch ungeklärt, ob die Präsenz des Helfervirus für die stärkere Expansion (Abb. 5.11) und CTL-Aktivität (Abb. 5.12) in AMP-OVA-immunisierten Mäusen im Vergleich zu _{hf}AMP-OVA-immunisierten Mäusen verantwortlich ist. Olschowka *et al.* haben berichtet, daß helfervirusfreie Amplikons deutlich schwächere inflammatorische Immunantworten induzieren, als helferviruskontaminierte Amplikons (Olschowka, J.A. *et al.*, 2003). Die erhöhte Zytokinproduktion (z.B. IL1- β , INF- γ oder TNF- α) könnte demnach für die stärkere Immunantwort nach Immunisierung mit AMP-OVA verantwortlich sein. Andererseits gibt es auch Hinweise, daß Helferviren ähnlich wie rekombinante HSV-1-Vektoren die Reifung von DCs und damit die Induktion einer Immunantwort negativ beeinflussen können (Salio, M. *et al.*, 1999; Willis, R.A. *et al.*, 2001). Um Aufschluß darüber zu gewinnen, ob die

Immunisierung mit AMP-OVA oder $_{\text{hf}}$ AMP-OVA zu unterschiedlichen inflammatorischen Immunantworten führt, müßte die Zytokinproduktion in immunisierten Mäusen untersucht werden. Die Reifung von DCs könnte *in vitro* analysiert werden.

Wie zuvor für die Antikörperantwort konnte auch für die CD8-T-Zellantwort nachgewiesen werden, daß sie von der Injektionsroute von HSV-OVA abhängig ist (Abb. 5.13 und 15). Die Injektionsroute spielte sowohl für das Ausmaß der Expansion als auch für deren Kinetik eine Rolle. Die i.p. Immunisierung resultierte in der stärksten Expansion, und die i.d. Immunisierung führte zu einer verlangsamten Expansionskinetik. Hocknell *et al.* maßen im *ex vivo* ELISPOT-Test drei Wochen nach i.d. Immunisierung eine stärkere CTL-Antwort, als nach i.p. Immunisierung (Hocknell, P.K. *et al.*, 2002). In dieser Studie wurde allerdings die Kinetik nicht berücksichtigt. Bedingt durch die langsamere Expansion konnten 18 Tage nach i.d. Immunisierung mit HSV-OVA auch in der vorliegenden Arbeit die höheren Frequenzen OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CD8-T-Zellen gemessen werden. Da HSV-1 eine Vielzahl verschiedener Zelltypen infizieren kann, ist es schwierig festzustellen, welche Zellen bei den jeweiligen Injektionsrouten für die Antigenexpression und -präsentierung verantwortlich sind. Langerhanszellen in der Epidermis spielen eine wichtige Rolle in HSV-1-Infektionen (Sprecher, E. und Y. Becker, 1987; Sprecher, E. und Y. Becker, 1988; Sprecher, E. und Y. Becker, 1989). Kürzlich demonstrierten Allan *et al.* jedoch, daß Langerhanszellen zwar bei der Induktion einer antiviralen CTL-Antwort gegen HSV-1 beteiligt sind, daß aber die epidermale virale Immunität durch CD8 α -positive DCs und nicht durch Langerhanszellen induziert wird (Allan, R.S. *et al.*, 2003). Auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht bekannt sind, könnte dies eine mögliche Erklärung für die verlangsamte Expansion nach i.d. Immunisierung sein, da der Vorgang des Antigentransfers von transfizierten Langerhanszellen auf CD8 α -positive DCs eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt. I.v. oder i.p. Immunisierungen mit HSV-OVA könnten zu einer direkten Transfektion der in den Lymphknoten ansässigen CD8 α -positiven DCs und somit zu einer schnelleren Expansion führen.

Die Immunisierungsrouten, die zu einer CD8-T-Zellexpansion führten (i.v., i.p. und i.d.), induzierten auch CTL-Antworten in RIP-OVA₁₀-Mäusen (Abb. 5.14). In diesem Versuch wurde allerdings nur ein Teil der Mäuse und nur für einen begrenzten Zeitraum diabetisch, während in dem Versuch zu Abb. 5.9 alle HSV-OVA-immunisierten Mäuse diabetisch wurden und es bis zum Ende des Untersuchungszeitraums blieben. Der Grund für die Abschwächung der CTL-Antwort liegt vermutlich in der regelmäßigen Blutabnahme im Versuch zu Abb. 5.14. Daß Blutverlust einen hemmenden Effekt auf die Immunantwort hat,

konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Abraham, E. und A.A. Freitas, 1989; Cue, J.I. *et al.*, 1992; Stephan, R.N. *et al.*, 1987; Zapata-Sirvent, R.L. *et al.*, 1992). Ob dies für die hier gezeigten Ergebnisse zutrifft, muß allerdings noch in vergleichenden Experimenten untersucht werden.

6.3 Protektion gegen Infektion mit intrazellulären Bakterien

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, daß Immunisierungen mit der *Gene Gun* oder dem rekombinanten HSV-1-Vektor zu unterschiedlichen Immunantworten führen. *Gene Gun*-Immunisierungen induzierten stärkere Antikörper- und CD4-T-Zellantworten, und Immunisierungen mit HSV-OVA induzierten stärkere CD8-T-Zellantworten. Um die Effizienz der beiden Vakzine – CMV-OVA und HSV-OVA – zu testen, wurden vakzinierte Mäuse mit rekombinanten, OVA-exprimierenden *Listeria monocytogenes* infiziert.

Immunisierungen mit HSV-OVA schützten Mäuse vor Infektionen mit *LM*-OVA (Abb. 5.15c). Obwohl in DNA-vakzinierten Mäusen keine signifikante, antigenspezifische CD8-T-Zellexpansion zu messen war und trotz der T_H2-gerichteten T-Helferzellantwort, waren auch diese Tiere geschützt, wenn sie mit niedrigen bis mittleren *LM*-OVA-Dosen infiziert wurden (Abb. 5.15c und 3.16c). Die erhöhten Frequenzen OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CD8-T-Zellen in den Milzen der DNA-vakzinierten Mäuse zehn Tage nach der Infektion (Abb. 5.15d) wurden vermutlich dadurch hervorgerufen, daß die Listerien länger in diesen Mäusen existierten und Antigen (OVA) exprimieren konnten als in HSV-OVA-immunisierten Mäusen. Diese Vermutung wurde durch die Analyse der Milzen und Lebern bestätigt, die die schnellere Beseitigung der Listerien in HSV-OVA-immunisierten Mäusen zeigte (Abb. 5.16a und b). Als Konsequenz der geringen Frequenz OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CD8-T-Zellen und der damit verbundenen langsameren Beseitigung der Listerien war die durch die *Gene Gun*-Immunisierung induzierte Immunantwort nicht ausreichend, um Mäuse vor einer Infektion mit einer hohen *LM*-OVA-Dosis zu schützen (Abb. 5.16d). Diese Ergebnisse unterstreichen Daten anderer Studien, in denen DNA-Vakzinierungen ebenfalls nur zu einer partiellen Immunität führten und die Immunantworten durch verschiedene *prime/boost*-Protokolle verstärkt werden konnten (An, L.L. *et al.*, 1996; Feng, C.G. *et al.*, 2001; McConkey, S.J. *et al.*, 2003; McShane, H. *et al.*, 2001; Tanghe, A. *et al.*, 2001; Yoshida, A. *et al.*, 2001). Eine einmalige Immunisierung

mit der rekombinanten HSV-1-Vakzine reichte dagegen aus, um Mäuse auch vor Infektionen mit sehr hohen Dosen mit intrazellulären Bakterien zu schützen. Dies bestätigt die Untersuchungen, die gezeigt haben, daß es vor allem die CD8-T-Zellantwort ist, die vor Listerien-Infektionen schützt (Übersichtsartikel: Wong, P. und E.G. Pamer, 2003). Inwieweit die stärkere Antikörper- und CD4-T-Zellantwort nach der DNA-Immunisierung an dem Immunschutz beteiligt sind, ist nicht klar. Auch wenn gezeigt wurde, daß B-Zellen und CD4-T-Zellen nur eine untergeordnete Rolle bei der Beseitigung einer Listerieninfektion spielen (Shedlock, D.J. *et al.*, 2003; Shen, H. *et al.*, 2003), gibt es auch mehrere Hinweise auf protektive CD4-T-Zellen (Geginat, G. *et al.*, 1998; Schluter, D. *et al.*, 1995; Serody, J.S. *et al.*, 1996). Neben der direkten antibakteriellen Funktion ist es auch wahrscheinlich, daß CD4-T-Zellen durch Interaktionen zwischen CD40 und CD40L kostimulierend auf die CD8-T-Zellantwort wirken (Kaufmann, S.H., 1988; Rolph, M.S. und S.H. Kaufmann, 2001).

B-Zellen und CD4-T-Zellen sind im Laufe einer Listerieninfektion notwendig, um eine optimale CD8-Gedächtniszellantwort zu generieren (Shedlock, D.J. *et al.*, 2003; Shen, H. *et al.*, 2003). Die schwache Antikörperantwort und CD4-T-Zellhilfe nach Immunisierung mit HSV-OVA hatte jedoch keinen negativen Einfluß auf die langanhaltende Gedächtniszellantwort, so daß Mäuse auch 42 Tage nach Vakzinierung vor einer Listerieninfektion geschützt waren (Abb. 5.17c). Auch *Gene Gun*-immunisierte Mäuse waren innerhalb dieses Zeitraums geschützt, was wiederum auf eine synergistische Wirkung der Antikörper- und CD4-T-Zellantwort hindeutet. Antikörper könnten dabei besonders wichtig für eine sofortige Opsonisierung von *LM* gleich nach der intravenös erfolgten Infektion sein. Letale Infektionen mit *LM* sind in der Maus nur intravenös durchzuführen, da die Maus keinen natürlichen Wirt dieses Bakteriums darstellt. Insofern läßt sich nicht untersuchen, ob eine der beiden Vakzinierungen im Falle einer Infektion peripherer Gewebe weniger wirksam wäre.

In dem Versuch zu Abb. 5.15 erfolgte die Infektion innerhalb der Primärantwort auf die Vakzinierung und dementsprechend stand in HSV-OVA-immunisierten Tieren eine große Menge Effektorzellen zur sofortigen Verfügung, wodurch die Listerien schnell eliminiert werden konnten. In dem Versuch zu Abb. 5.17 wurde dagegen der durch die beiden Vakzine induzierte Langzeitschutz überprüft. Eine Sekundärantwort, wie in Abb. 5.17b gezeigt, zeichnet sich u.a. dadurch aus, daß Gedächtnis-T-Zellen schneller als naive Zellen zu Effektorzellen ausdifferenzieren und stärker expandieren (Bachmann, M.F. *et al.*, 1999; Cho, B.K. *et al.*, 1999; Garcia, S. *et al.*, 1999; Iezzi, G. *et al.*, 2001; Kedl, R.M. und M.F. Mescher, 1998; Rogers, P.R. *et al.*, 2000; Veiga-Fernandes, H. *et al.*, 2000; Zimmermann,

C. *et al.*, 1999). Die stärkere und schnellere Expansion OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CD8-T-Zellen nach der LM-OVA-Infektion zeigt demnach, daß die HSV-OVA-Immunisierung zu einer effektiveren CD8-Gedächtniszellbildung geführt hat, als die DNA-Immunisierung (Abb. 5.17b, Tage 47 und 49). Dies entspricht den Daten anderer Gruppen, die zeigten, daß die Größe der T-Zellgedächtnispopulation direkt mit der Größe der Effektorzellpopulation korreliert (Busch, D.H. *et al.*, 1998; Hou, S. *et al.*, 1994; Murali-Krishna, K. *et al.*, 1998; Vijh, S. und E.G. Pamer, 1997). Entsprechend der Einteilung von Sallusto *et al.* handelt es sich bei den an Tag 39 im Blut detektierten Zellen vermutlich hauptsächlich um Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}-Zellen) (Sallusto, F. *et al.*, 1999). Diese Zellpopulation befindet sich in einem permanent aktivierten Zustand und bietet einen sofortigen Immunschutz. Zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}-Zellen) halten sich vorwiegend in peripheren lymphatischen Organen auf und können innerhalb kurzer Zeit in Effektorzellen differenzieren. Eine Analyse der CD62L- und CCR7-Expression auf T-Zellen in Kombination mit einer Tetramerfärbung könnte Aufschluß darüber bringen, inwieweit HSV-OVA-Immunisierungen zur Bildung von T_{CM}- und T_{EM}-Zellen beitragen. Desweiteren muß noch überprüft werden, ob die Gedächtnisantwort nach HSV-OVA-Immunisierung auch ausreicht, um Mäuse vor hohen Infektionsdosen zu schützen.

Die genaue Rolle der beiden Zytokine INF- γ und TNF- α bei der Bekämpfung einer Listerieninfektion ist umstritten. Die Expression dieser Zytokine durch Listerien-spezifische CD8-T-Zellen ist für die Resistenz nicht unbedingt notwendig (Harty, J.T. und M.J. Bevan, 1995; White, D.W. *et al.*, 2000). INF- γ - und TNF- α -*knockout*-Mäuse sind jedoch deutlich anfälliger für eine Listerieninfektion und weisen stark beeinträchtigte antibakterielle Aktivitäten in den Makrophagen auf (Dai, W.J. *et al.*, 1997; Harty, J.T. und M.J. Bevan, 1995; Mizuki, M. *et al.*, 2002). Um die Zytokinexpression in den immunisierten und infizierten Mäusen zu untersuchen, wurden intrazelluläre Färbungen der Milzzellen durchgeführt (Abb. 5.18). In den aktivierten OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischen CD8-T-Zellen beider Gruppen konnte nur eine geringe TNF- α -Produktion festgestellt werden. Im Vergleich zu den hohen Frequenzen im Blut und in der Milz exprimierten auch nur ein kleiner Teil dieser Zellen INF- γ . Ein Grund für die geringe Zytokinexpression durch CD8-T-Zellen könnte der Zeitpunkt der Messung sein. Eine stärkere Zytokinexpression könnte zu früheren Zeitpunkten der Sekundärantwort stattgefunden haben. In einer Studie von Mizuki *et al.* wurde das Maximum der INF- γ - und TNF- α -Produktion in Leber und Milz zwei bzw. drei Tage nach der Listerieninfektion gemessen (Mizuki, M. *et al.*, 2002). In dieser Studie wurde allerdings die Gesamtproduktion in den jeweiligen Organen gemessen,

und es handelte sich um eine Primärantwort. Die stärkere Zytokinexpression von LLO₁₉₀₋₂₀₁-spezifischen CD4-T-Zellen in *Gene Gun*-immunisierten Mäusen kann auf die langsamere Beseitigung der Listerien zurückgeführt werden. In diesen Mäusen konnte *LM-OVA* für einen gewissen Zeitraum persistieren und das lytische Protein Listeriolysin O (LLO) sezernieren. Durch die Präsentation des Peptids LLO₁₉₀₋₂₀₁ auf MHC-II-Molekülen konnte eine CD4-T-Zellantwort mit der entsprechenden Zytokinproduktion induziert werden. Durch die starke CTL-Antwort in HSV-OVA-immunisierten Mäusen wurden die Listerien so schnell eliminiert, daß nicht genügend LLO₁₉₀₋₂₀₁ präsentiert wurde, um eine CD4-T-Zellantwort zu induzieren.

6.4. Einfluß bestehender antiviraler Immunantwort auf die Vakzinierungseffizienz von rHSV-1

Mittlerweile wurde eine Vielzahl an verschiedenen rekombinanten, viralen Vektorsystemen entwickelt (Tabelle 3.2 und Übersichtsartikel: Thomas, C.E. *et al.*, 2003). Ein generelles Problem bei der Verwendung viraler Gentherapie- oder Impfstoffvektoren ist die antivirale Immunantwort, die entweder durch natürliche Infektionen bereits bestehen kann oder durch eine erste Immunisierung entstanden ist. Im Falle von Adeno- und Vacciniavirusvektoren konnte ein negativer Effekt auf die Wirksamkeit der Vakzine durch eine bestehende antivirale Immunantwort bereits nachgewiesen werden (Cooney, E.L. *et al.*, 1993; Flexner, C. *et al.*, 1988; Hammond, S.A. *et al.*, 1992; Schulick, A.H. *et al.*, 1997). Da weltweit in verschiedenen Populationen zwischen 60% und mehr als 95% der Bevölkerung mit HSV-1 infiziert sind (Cunningham, A.L., Mindel, A., Dwyer, D. E., 2000; Stanberry, L.R. *et al.*, 2000), ist es wichtig die Konsequenzen der vorhandenen Immunität auf rekombinante HSV-1-Vektoren zu untersuchen. Bisherige Studien, die dieser Frage nachgegangen sind, lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Bei einer HSV-basierten onkolytischen Therapie wurde kein negativer Effekt der anti-HSV-Immunität auf die Effizienz der Therapie festgestellt (Chahlavi, A. *et al.*, 1999). Zu dem selben Ergebnis kamen Brockman und Knipe, die die Immunantwort gegen β -Galaktosidase nach Immunisierung mit einem rekombinanten HSV-1-Vektor untersuchten (Brockman, M.A. und D.M. Knipe, 2002). Einen negativen Effekt auf die Wirksamkeit ihres jeweiligen HSV-1-Vektors durch eine vorhandene antivirale Immunantwort fanden dagegen Herrlinger *et al.*, die ebenfalls eine Tumorthherapie untersuchten und Hocknell *et al.*, die gp120-exprimierende Amplikons

verwendeten (Herrlinger, U. *et al.*, 2000; Hocknell, P.K. *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst überprüft, ob die Injektion der beiden Vektoren HSV-OVA und HSV-GFP die Bildung von Antikörpern gegen die Virushülle induziert. Wie erwartet, induzierten beide Vektoren ähnliche humorale Immunantworten (Abb. 5.19). Obwohl Antikörper beider Isotypen (IgG1 und IgG2a) gebildet wurden, konnte auch hier, wie zuvor bei der Antikörperantwort gegen OVA, die Tendenz zu einer IgG2a-dominierten IgG-Antwort beobachtet werden. Dies entspricht den Daten von Brubaker *et al.*, die feststellten, daß die humorale Immunantwort auf ein exogenes Genprodukt von dem selben Typ ist, wie die Antwort auf virale Antigene (Brubaker, J.O. *et al.*, 1996). Der Kontrollvektor HSV-GFP wurde hiernach verwendet, um in Mäusen eine anti-HSV-Antwort zu induzieren. In HSV-GFP vorbehandelten Mäusen war die Effizienz der HSV-OVA-Vakzine stark herabgesetzt, was sich in einer reduzierten OVA-spezifischen CD8-T-Zellexpansion zeigte (Abb. 5.20). Wurden RIP-OVA-Mäuse mit HSV-GFP vorbehandelt, konnten ebenfalls anti-HSV-Antikörper detektiert werden (Abb. 5.21). Dabei wurde allerdings festgestellt, daß die Route der HSV-GFP-Injektion die Stärke der antiviralen Antikörperantwort bestimmt. Mäuse, die hohe anti-HSV-Antikörpertiter hatten, wurden kaum (i.p. und i.d.) oder gar nicht (i.v.) diabetisch. Subkutan vorbehandelte Mäuse hatten nur geringe Titer und wurden größtenteils diabetisch. Diese Ergebnisse zeigen erstens, daß die Immunisierung mit einem rekombinanten HSV-1-Vektor eine antivirale Immunantwort induziert, zweitens, daß diese Antwort in Abhängigkeit zu der Injektionsroute steht und drittens, daß eine bestehende antivirale Immunantwort einen stark negativen Effekt auf die CD8-T-Zellantwort (Expansion und CTL-Effektorfunktion) gegen das Genprodukt eines Transgens hat. Insofern bestätigen diese Ergebnisse die von Hocknell *et al.* (Hocknell, P.K. *et al.*, 2002) und stehen im Kontrast zu denen von Brockman und Knipe (Brockman, M.A. und D.M. Knipe, 2002). Da der hemmende Effekt mit der Höhe der anti-HSV-IgG-Titer korreliert, kann davon ausgegangen werden, daß Antikörper an der Abschwächung der rekombinanten Vektoren maßgeblich beteiligt sind. Eine Reduzierung der Virusverbreitung im Zentralnervensystem durch Antikörper, sowie synergistische Wirkungen von Antikörpern und T-Helferzellen wurden bereits beschrieben (Morrison, L.A. *et al.*, 2001; Whitley, R.J., 1988). Da verschiedene Epitope von HSV-1 bekannt sind, gegen die T-Zellantworten induziert werden und auch die Rolle von zytotoxischen CD4-T-Zellen bei der Virusbekämpfung diskutiert wird (Manickan, E. *et al.*, 1995; Yasukawa, M. *et al.*, 1988), ist es wahrscheinlich, daß der beobachtete hemmende Effekt sowohl durch humorale als auch zelluläre Immunantworten gegen HSV-1-Antigene zustande kommt. Der Grund für die Diskrepanz zwischen der Studie von Brockman und Knipe (Brockman, M.A. und D.M.

Knipe, 2002) und der vorliegenden Arbeit ist mit den vorliegenden Daten nicht eindeutig zu klären. In beiden Untersuchungen wurden homologe Virusstämme für die Vorimmunisierung und die Immunisierung verwendet, und es konnten jeweils antivirale Immunantworten detektiert werden. Ein wichtiger Unterschied liegt in dem Applikationsweg der Immunisierung: Brockman und Knipe injizierten das rekombinante Virus s.k., wohingegen HSV-OVA in der vorliegenden Studie i.p. oder i.v. injiziert wurde. Durch die systemische Injektion sind die Virionen sofort der opsonisierenden und neutralisierenden Wirkung antiviraler Antikörper ausgesetzt. Insofern muß in weiteren Experimenten geklärt werden, ob der beschriebene hemmende Effekt auch nach s.k. Immunisierung zu beobachten ist. Auch wenn es sich bei beiden Vektoren um replikationsdefekte HSV-1-Mutanten handelt, muß bedacht werden, daß die Replikationsdefizienz durch Deletion unterschiedlicher Gene erreicht wurde. Die verbleibenden Gene könnten insofern einen Einfluß auf die jeweiligen Experimente haben, und es ist fraglich, ob die beiden Konstrukte direkt miteinander verglichen werden können.

7 AUSBLICK

Immunisierungen mit Plasmid-DNA und rekombinanten, viralen Vektoren werden als genetische Immunisierungen bezeichnet, da das Antigen erst durch die Expression eines Transgens in den Organismus gelangt. Trotz dieser Gemeinsamkeit haben die durchgeführten Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß sich die induzierten Immunantworten nach Vakzinierung mit den verschiedenen Vektoren bzw. Methoden teilweise sehr stark voneinander unterscheiden. DNA-Immunisierungen per *Gene Gun* haben sich als verlässliche Methode herausgestellt, um humorale und zelluläre Immunantworten zu induzieren, die vor Infektionen mit intrazellulären Bakterien schützen können. DNA-Vakzinen sind zudem einfach und kostengünstig herzustellen und können als sichere Impfstoffe betrachtet werden. Das Problem der DNA-Immunisierung ist momentan die Übertragung der vielversprechenden Ergebnisse in Mäusen auf größere Organismen wie den Menschen. Aufgrund der relativ einfachen Struktur der DNA-Vakzine bietet diese Methode allerdings vielfältige Möglichkeiten der Verbesserung. Darunter fallen beispielsweise die Veränderung der zellulären Lokalisierung, Koexpression von Zytokinen oder kostimulatorischen Molekülen, Codonoptimierung des Transgens, Insertion spezifischer Signalsequenzen, Verwendung verschiedener Trägermoleküle sowie die Applikation mittels verschiedener Methoden (Übersichtsartikel : Gurunathan, S. *et al.*, 2000).

Die in dieser Arbeit untersuchten viralen Vektoren stellten sich als potente Vakzine heraus, die vor allem in der Lage waren, starke CTL-Antworten zu induzieren. Ein direkter, quantitativer Vergleich mit der DNA-Vakzine ist aufgrund der methodischen Unterschiede nur bedingt möglich und auch nicht beabsichtigt gewesen. Vielmehr galt die DNA-Immunisierung als gut untersuchter Standard. Dennoch lassen sich zahlreiche qualitative Unterschiede und auch quantitative Tendenzen erkennen. Replikationsdefekte HSV-1-Vektoren können zwar nach dem aktuellen Stand der Forschung als sicher angesehen werden, die genauen Einflüsse viraler Gene und Proteine auf die Immunantwort müssen jedoch noch genauer untersucht werden, bevor sie als Impfstoffe am Menschen eingesetzt werden können. Als bessere Alternative können daher momentan HSV-1-Amplikons gelten, die, insofern helfervirusfrei, keine viralen Gene enthalten. Neben den möglichen immunmodulatorischen Aktivitäten viraler Proteine liegt das Problem dieser Vektoren momentan noch in der Produktion, obwohl die Herstellung helfervirusfreier Amplikons durch die Einführung des cre/loxP-Systems deutlich verbessert wurde (Zaupa, C. *et al.*,

2003). Dies war auch ein limitierender Faktor in dieser Arbeit, da nicht genügend Amplikons für alle Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden konnten. Die starken CTL-Antworten lassen die untersuchten HSV-Vektoren als vielversprechende Kandidaten für Vakzinen gegen intrazelluläre Bakterien, Viren und Tumore erscheinen.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abraham, E. und A.A. Freitas (1989). Hemorrhage produces abnormalities in lymphocyte function and lymphokine generation, *J Immunol* **142** (3), 899-906.

Akbari, O., N. Panjwani, S. Garcia, R. Tascon, D. Lowrie und B. Stockinger (1999). DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity, *J Exp Med* **189** (1), 169-78.

Allan, R.S., C.M. Smith, G.T. Belz, A.L. van Lint, L.M. Wakim, W.R. Heath und F.R. Carbone (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells, *Science* **301** (5641), 1925-8.

Altman, J.D., P.A. Moss, P.J. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael und M.M. Davis (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, *Science* **274** (5284), 94-6.

An, L.L., E. Pamer und J.L. Whitton (1996). A recombinant minigene vaccine containing a nonameric cytotoxic-T- lymphocyte epitope confers limited protection against *Listeria monocytogenes* infection, *Infect Immun* **64** (5), 1685-93.

Asseman, C. und M. von Herrath (2002). About CD4pos CD25pos regulatory cells, *Autoimmun Rev* **1** (4), 190-7.

Bachmann, M.F., M. Barner, A. Viola und M. Kopf (1999). Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection, *Eur J Immunol* **29** (1), 291-9.

Badovinac, V.P., B.B. Porter und J.T. Harty (2002). Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection, *Nat Immunol* **3** (7), 619-26.

Ban, E., L. Dupre, E. Hermann, W. Rohn, C. Vendeville, B. Quatannens, P. Ricciardi-Castagnoli, A. Capron und G. Riveau (2000). CpG motifs induce Langerhans cell migration in vivo, *Int Immunol* **12** (6), 737-45.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran und K. Palucka (2000). Immunobiology of dendritic cells, *Annu Rev Immunol* **18** 767-811.

Barcy, S. und L. Corey (2001). Herpes simplex inhibits the capacity of lymphoblastoid B cell lines to stimulate CD4+ T cells, *J Immunol* **166** (10), 6242-9.

Beverley, P.C. (2002). Immunology of vaccination, *Br Med Bull* **62** 15-28.

Beverley, P.C. und M.K. Maini (2000). Differences in the regulation of CD4 and CD8 T-cell clones during immune responses, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355** (1395), 401-6.

- Bhardwaj, V., O. Kanagawa, P.E. Swanson und E.R. Unanue (1998). Chronic Listeria infection in SCID mice: requirements for the carrier state and the dual role of T cells in transferring protection or suppression, *J Immunol* **160** (1), 376-84.
- Bielecki, J., P. Youngman, P. Connelly und D.A. Portnoy (1990). Bacillus subtilis expressing a haemolysin gene from Listeria monocytogenes can grow in mammalian cells, *Nature* **345** (6271), 175-6.
- Blanas, E., F.R. Carbone, J. Allison, J.F. Miller und W.R. Heath (1996). Induction of autoimmune diabetes by oral administration of autoantigen, *Science* **274** (5293), 1707-9.
- Boyle, J.S., J.L. Brady und A.M. Lew (1998). Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction, *Nature* **392** (6674), 408-11.
- Boyle, J.S., C. Koniaras und A.M. Lew (1997a). Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization, *Int Immunol* **9** (12), 1897-906.
- Boyle, J.S., A. Silva, J.L. Brady und A.M. Lew (1997b). DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (26), 14626-31.
- Boynton, J.E., N.W. Gillham, E.H. Harris, J.P. Hosler, A.M. Johnson, A.R. Jones, B.L. Randolph-Anderson, D. Robertson, T.M. Klein, K.B. Shark und et al. (1988). Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles, *Science* **240** (4858), 1534-8.
- Brockner, T. (1997). Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells, *J Exp Med* **186** (8), 1223-32.
- Brockman, M.A. und D.M. Knipe (2002). Herpes simplex virus vectors elicit durable immune responses in the presence of preexisting host immunity, *J Virol* **76** (8), 3678-87.
- Brubaker, J.O., C.M. Thompson, L.A. Morrison, D.M. Knipe, G.R. Siber und R.W. Finberg (1996). Th1-associated immune responses to beta-galactosidase expressed by a replication-defective herpes simplex virus, *J Immunol* **157** (4), 1598-604.
- Bruce, W.B., A.H. Christensen, T. Klein, M. Fromm und P.H. Quail (1989). Photoregulation of a phytochrome gene promoter from oat transferred into rice by particle bombardment, *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** (24), 9692-6.
- Burnet, F.M. (1959). *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity* (London, Cambridge University Press).

Busch, D.H., I.M. Pilip, S. Vijn und E.G. Pamer (1998). Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection, *Immunity* **8** (3), 353-62.

Calarota, S.A., A. Kjerrstrom, K.B. Islam und B. Wahren (2001). Gene combination raises broad human immunodeficiency virus-specific cytotoxicity, *Hum Gene Ther* **12** (13), 1623-37.

Calarota, S.A., A.C. Leandersson, G. Bratt, J. Hinkula, D.M. Klinman, K.J. Weinhold, E. Sandstrom und B. Wahren (1999). Immune responses in asymptomatic HIV-1-infected patients after HIV-DNA immunization followed by highly active antiretroviral treatment, *J Immunol* **163** (4), 2330-8.

Cardon, L.R., C. Burge, D.A. Clayton und S. Karlin (1994). Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes, *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (9), 3799-803.

Casares, S., K. Inaba, T.D. Brumeanu, R.M. Steinman und C.A. Bona (1997). Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope, *J Exp Med* **186** (9), 1481-6.

Chahlavi, A., S. Rabkin, T. Todo, P. Sundaresan und R. Martuza (1999). Effect of prior exposure to herpes simplex virus 1 on viral vector-mediated tumor therapy in immunocompetent mice, *Gene Ther* **6** (10), 1751-8.

Chien, A., D.B. Edgar und J.M. Trela (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*, *J Bacteriol* **127** (3), 1550-7.

Cho, B.K., C. Wang, S. Sugawa, H.N. Eisen und J. Chen (1999). Functional differences between memory and naive CD8 T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (6), 2976-81.

Cho, J.H., J.W. Youn und Y.C. Sung (2001). Cross-priming as a predominant mechanism for inducing CD8(+) T cell responses in gene gun DNA immunization, *J Immunol* **167** (10), 5549-57.

Chun, E., J. Lee, H.S. Cheong und K.Y. Lee (2003). Tumor eradication by hepatitis B virus X antigen-specific CD8+ T cells in xenografted nude mice, *J Immunol* **170** (3), 1183-90.

Coffin, R.S., S.K. Thomas, N.S. Thomas, C.E. Lilley, A.R. Pizzey, C.H. Griffiths, B.J. Gibb, M.J. Wagstaff, S.J. Inges, M.H. Binks, *et al.* (1998). Pure populations of transduced primary human cells can be produced using GFP expressing herpes virus vectors and flow cytometry, *Gene Ther* **5** (5), 718-22.

Colditz, G.A., T.F. Brewer, C.S. Berkey, M.E. Wilson, E. Burdick, H.V. Fineberg und F. Mosteller (1994). Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature, *Jama* **271** (9), 698-702.

Coles, R.M., S.N. Mueller, W.R. Heath, F.R. Carbone und A.G. Brooks (2002). Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1, *J Immunol* **168** (2), 834-8.

- Condon, C., S.C. Watkins, C.M. Celluzzi, K. Thompson und L.D. Falo, Jr. (1996). DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells, *Nat Med* **2** (10), 1122-8.
- Cooney, E.L., M.J. McElrath, L. Corey, S.L. Hu, A.C. Collier, D. Arditti, M. Hoffman, R.W. Coombs, G.E. Smith und P.D. Greenberg (1993). Enhanced immunity to human immunodeficiency virus (HIV) envelope elicited by a combined vaccine regimen consisting of priming with a vaccinia recombinant expressing HIV envelope and boosting with gp160 protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (5), 1882-6.
- Cornell, K.A., H.G. Bouwer, D.J. Hinrichs und R.A. Barry (1999). Genetic immunization of mice against *Listeria monocytogenes* using plasmid DNA encoding listeriolysin O, *J Immunol* **163** (1), 322-9.
- Corr, M., D.J. Lee, D.A. Carson und H. Tighe (1996). Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming, *J Exp Med* **184** (4), 1555-60.
- Corr, M., A. von Damm, D.J. Lee und H. Tighe (1999). In vivo priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer, *J Immunol* **163** (9), 4721-7.
- Coutelier, J.P., J. Van Broeck und S.F. Wolf (1995). Interleukin-12 gene expression after viral infection in the mouse, *J Virol* **69** (3), 1955-8.
- Cowdery, J.S., J.H. Chace, A.K. Yi und A.M. Krieg (1996). Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides, *J Immunol* **156** (12), 4570-5.
- Creusot, R.J., J.S. Biswas, L.L. Thomsen, J.P. Tite, N.A. Mitchison und B.M. Chain (2003). Instruction of naive CD4+ T cells by polarized CD4+ T cells within dendritic cell clusters, *Eur J Immunol* **33** (6), 1686-96.
- Creusot, R.J., L.L. Thomsen, C.A. van Wely, P. Topley, J.P. Tite und B.M. Chain (2001). Early commitment of adoptively transferred CD4+ T cells following particle-mediated DNA vaccination: implications for the study of immunomodulation, *Vaccine* **19** (13-14), 1678-87.
- Croen, K.D., J.M. Ostrove, L.J. Dragovic, J.E. Smialek und S.E. Straus (1987). Latent herpes simplex virus in human trigeminal ganglia. Detection of an immediate early gene "anti-sense" transcript by in situ hybridization, *N Engl J Med* **317** (23), 1427-32.
- Cue, J.I., J.C. Peyton und M.A. Malangoni (1992). Does blood transfusion or hemorrhagic shock induce immunosuppression?, *J Trauma* **32** (5), 613-7.
- Cunningham, A.L., Mindel, A., Dwyer, D. E. (2000). Global epidemiology of sexually transmitted diseases. In *Sexually Transmitted Disease*, Stanberry, L. R., Bernstein, D., ed. (San Diego, Academic Press), pp. 3-42.

- Dai, W.J., W. Bartens, G. Kohler, M. Hufnagel, M. Kopf und F. Brombacher (1997). Impaired macrophage listericidal and cytokine activities are responsible for the rapid death of *Listeria monocytogenes*-infected IFN-gamma receptor-deficient mice, *J Immunol* **158** (11), 5297-304.
- Darcy, P.K., N.M. Haynes, M.B. Snook, J.A. Trapani, L. Cerruti, S.M. Jane und M.J. Smyth (2000). Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by ex vivo genetically engineered CTL, *J Immunol* **164** (7), 3705-12.
- DeKruyff, R.H., L.V. Rizzo und D.T. Umetsu (1993). Induction of immunoglobulin synthesis by CD4+ T cell clones, *Semin Immunol* **5** (6), 421-30.
- DeLuca, N.A., A.M. McCarthy und P.A. Schaffer (1985). Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4, *J Virol* **56** (2), 558-70.
- Dempsey, P.W., S.E. Doyle, J.Q. He und G. Cheng (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily, *Cytokine Growth Factor Rev* **14** (3-4), 193-209.
- Dent, C.L., J.K. Estridge, L.M. Kemp und D.S. Latchman (1990). Inhibition of histone H2B gene transcription and of cellular growth by a truncated viral trans-activator protein, *Mol Cell Biol* **10** (6), 3258-61.
- Dieu, M.C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J.M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque und C. Caux (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites, *J Exp Med* **188** (2), 373-86.
- Dixon, R.A. und P.A. Schaffer (1980). Fine-structure mapping and functional analysis of temperature-sensitive mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate early protein VP175, *J Virol* **36** (1), 189-203.
- Doe, B., M. Selby, S. Barnett, J. Baenziger und C.M. Walker (1996). Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (16), 8578-83.
- Doherty, P.C., D.J. Topham und R.A. Tripp (1996). Establishment and persistence of virus-specific CD4+ and CD8+ T cell memory, *Immunol Rev* **150** 23-44.
- Doherty, P.C. und R.M. Zinkernagel (1974). T-cell-mediated immunopathology in viral infections, *Transplant Rev* **19** (0), 89-120.
- Donnelly, J.J., J.B. Ulmer, J.W. Shiver und M.A. Liu (1997). DNA vaccines, *Annu Rev Immunol* **15** 617-48.
- Donnelly, M. und G. Elliott (2001). Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14, *J Virol* **75** (6), 2566-74.

- Dowler, K.W. und R.W. Veltri (1984). In vitro neutralization of HSV-2: inhibition by binding of normal IgG and purified Fc to virion Fc receptor (FcR), *J Med Virol* **13** (3), 251-9.
- Drew, D.R., M. Lightowers und R.A. Strugnell (2000). Humoral immune responses to DNA vaccines expressing secreted, membrane bound and non-secreted forms of the *Tania ovis* 45W antigen, *Vaccine* **18** (23), 2522-32.
- Dudani, R., Y. Chapdelaine, H. Faassen Hv, D.K. Smith, H. Shen, L. Krishnan und S. Sad (2002). Multiple mechanisms compensate to enhance tumor-protective CD8(+) T cell response in the long-term despite poor CD8(+) T cell priming initially: comparison between an acute versus a chronic intracellular bacterium expressing a model antigen, *J Immunol* **168** (11), 5737-45.
- Dyall, R., L.V. Vasovic, R.A. Clynes und J. Nikolic-Zugic (1999). Cellular requirements for the monoclonal antibody-mediated eradication of an established solid tumor, *Eur J Immunol* **29** (1), 30-7.
- Elgadi, M.M., C.E. Hayes und J.R. Smiley (1999). The herpes simplex virus vhs protein induces endoribonucleolytic cleavage of target RNAs in cell extracts, *J Virol* **73** (9), 7153-64.
- Engering, A.J., M. Cella, D. Fluitsma, M. Brockhaus, E.C. Hoefsmit, A. Lanzavecchia und J. Pieters (1997). The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells, *Eur J Immunol* **27** (9), 2417-25.
- Fanger, N.A., K. Wardwell, L. Shen, T.F. Tedder und P.M. Guyre (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells, *J Immunol* **157** (2), 541-8.
- Farrell, H.E., C.S. McLean, C. Harley, S. Efstathiou, S. Inglis und A.C. Minson (1994). Vaccine potential of a herpes simplex virus type 1 mutant with an essential glycoprotein deleted, *J Virol* **68** (2), 927-32.
- Feltquate, D.M., S. Heaney, R.G. Webster und H.L. Robinson (1997). Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization, *J Immunol* **158** (5), 2278-84.
- Feng, C.G., U. Palendira, C. Demangel, J.M. Spratt, A.S. Malin und W.J. Britton (2001). Priming by DNA immunization augments protective efficacy of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin against tuberculosis, *Infect Immun* **69** (6), 4174-6.
- Fensterle, J., L. Grode, J. Hess und S.H. Kaufmann (1999). Effective DNA vaccination against listeriosis by prime/boost inoculation with the gene gun, *J Immunol* **163** (8), 4510-8.

Flexner, C., B.R. Murphy, J.F. Rooney, C. Wohlenberg, V. Yuferov, A.L. Notkins und B. Moss (1988). Successful vaccination with a polyvalent live vector despite existing immunity to an expressed antigen, *Nature* **335** (6187), 259-62.

Fraefel, C., S. Song, F. Lim, P. Lang, L. Yu, Y. Wang, P. Wild und A.I. Geller (1996). Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells, *J Virol* **70** (10), 7190-7.

Fu, T.M., L. Guan, A. Friedman, T.L. Schofield, J.B. Ulmer, M.A. Liu und J.J. Donnelly (1999). Dose dependence of CTL precursor frequency induced by a DNA vaccine and correlation with protective immunity against influenza virus challenge, *J Immunol* **162** (7), 4163-70.

Fu, T.M., J.B. Ulmer, M.J. Caulfield, R.R. Deck, A. Friedman, S. Wang, X. Liu, J.J. Donnelly und M.A. Liu (1997). Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes, *Mol Med* **3** (6), 362-71.

Fynan, E.F., R.G. Webster, D.H. Fuller, J.R. Haynes, J.C. Santoro und H.L. Robinson (1993). DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations, *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (24), 11478-82.

Garcia, S., J. DiSanto und B. Stockinger (1999). Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation, *Immunity* **11** (2), 163-71.

Geginat, G., M. Lalic, M. Kretschmar, W. Goebel, H. Hof, D. Palm und A. Bubert (1998). Th1 cells specific for a secreted protein of *Listeria monocytogenes* are protective in vivo, *J Immunol* **160** (12), 6046-55.

Geginat, G., S. Schenk, M. Skoberne, W. Goebel und H. Hof (2001). A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from *Listeria monocytogenes*, *J Immunol* **166** (3), 1877-84.

Gett, A.V. und P.D. Hodgkin (2000). A cellular calculus for signal integration by T cells, *Nat Immunol* **1** (3), 239-44.

Gulbranson-Judge, A. und I. MacLennan (1996). Sequential antigen-specific growth of T cells in the T zones and follicles in response to pigeon cytochrome c, *Eur J Immunol* **26** (8), 1830-7.

Gurunathan, S., K.R. Irvine, C.Y. Wu, J.I. Cohen, E. Thomas, C. Prussin, N.P. Restifo und R.A. Seder (1998). CD40 ligand/trimer DNA enhances both humoral and cellular immune responses and induces protective immunity to infectious and tumor challenge, *J Immunol* **161** (9), 4563-71.

Gurunathan, S., D.M. Klinman und R.A. Seder (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization*, *Annu Rev Immunol* **18** 927-74.

- Gyotoku, T., F. Ono und L. Aurelian (2002). Development of HSV-specific CD4+ Th1 responses and CD8+ cytotoxic T lymphocytes with antiviral activity by vaccination with the HSV-2 mutant ICP10DeltaPK, *Vaccine* **20** (21-22), 2796-807.
- Hammond, S.A., R.C. Bollinger, P.E. Stanhope, T.C. Quinn, D. Schwartz, M.L. Clements und R.F. Siliciano (1992). Comparative clonal analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4+ and CD8+ cytolytic T lymphocytes isolated from seronegative humans immunized with candidate HIV-1 vaccines, *J Exp Med* **176** (6), 1531-42.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* **166** (4), 557-80.
- Harty, J.T. und M.J. Bevan (1992). CD8+ T cells specific for a single nonamer epitope of *Listeria monocytogenes* are protective in vivo, *J Exp Med* **175** (6), 1531-8.
- Harty, J.T. und M.J. Bevan (1995). Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN gamma, *Immunity* **3** (1), 109-17.
- Havell, E.A. (1987). Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis, *J Immunol* **139** (12), 4225-31.
- Havell, E.A. (1989). Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance, *J Immunol* **143** (9), 2894-9.
- Haynes, J.R., D.E. McCabe, W.F. Swain, G. Widera und J.T. Fuller (1996). Particle-mediated nucleic acid immunization, *J Biotechnol* **44** (1-3), 37-42.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda und S. Akira (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature* **408** (6813), 740-5.
- Herrlinger, U., C.M. Kramm, K.S. Aboody-Guterman, J.S. Silver, K. Ikeda, K.M. Johnston, P.A. Pechan, R.F. Barth, D. Finkelstein, E.A. Chiocca, *et al.* (1998). Pre-existing herpes simplex virus 1 (HSV-1) immunity decreases, but does not abolish, gene transfer to experimental brain tumors by a HSV-1 vector, *Gene Ther* **5** (6), 809-19.
- Herrlinger, U., P.A. Pechan, A.H. Jacobs, C. Woiciechowski, N.G. Rainov, C. Fraefel, W. Paulus und S.A. Reeves (2000). HSV-1 infected cell proteins influence tetracycline-regulated transgene expression, *J Gene Med* **2** (5), 379-89.
- Hocknell, P.K., R.D. Wiley, X. Wang, T.G. Evans, W.J. Bowers, T. Hanke, H.J. Federoff und S. Dewhurst (2002). Expression of human immunodeficiency virus type 1 gp120 from herpes simplex virus type 1-derived amplicons results in potent, specific, and durable cellular and humoral immune responses, *J Virol* **76** (11), 5565-80.
- Hogquist, K.A., S.C. Jameson, W.R. Heath, J.L. Howard, M.J. Bevan und F.R. Carbone (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection, *Cell* **76** (1), 17-27.

Honess, R.W. und B. Roizman (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins, *J Virol* **14** (1), 8-19.

Honess, R.W. und B. Roizman (1975). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides, *Proc Natl Acad Sci U S A* **72** (4), 1276-80.

Hou, S., L. Hyland, K.W. Ryan, A. Portner und P.C. Doherty (1994). Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size, *Nature* **369** (6482), 652-4.

Iezzi, G., K. Karjalainen und A. Lanzavecchia (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells, *Immunity* **8** (1), 89-95.

Iezzi, G., D. Scheidegger und A. Lanzavecchia (2001). Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo, *J Exp Med* **193** (8), 987-93.

Inaba, K., J.P. Metlay, M.T. Crowley und R.M. Steinman (1990). Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ, *J Exp Med* **172** (2), 631-40.

Inaba, K. und R.M. Steinman (1985). Protein-specific helper T-lymphocyte formation initiated by dendritic cells, *Science* **229** (4712), 475-9.

Ireton, K. und P. Cossart (1997). Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*, *Annu Rev Genet* **31** 113-38.

Iwasaki, A., C.A. Torres, P.S. Ohashi, H.L. Robinson und B.H. Barber (1997). The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites, *J Immunol* **159** (1), 11-4.

Jakob, T., P.S. Walker, A.M. Krieg, M.C. Udey und J.C. Vogel (1998). Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA, *J Immunol* **161** (6), 3042-9.

Jelley-Gibbs, D.M., N.M. Lepak, M. Yen und S.L. Swain (2000). Two distinct stages in the transition from naive CD4 T cells to effectors, early antigen-dependent and late cytokine-driven expansion and differentiation, *J Immunol* **165** (9), 5017-26.

Jiang, W., W.J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R.M. Steinman und M.C. Nussenzweig (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing, *Nature* **375** (6527), 151-5.

Johnson, P.A., M.J. Wang und T. Friedmann (1994). Improved cell survival by the reduction of immediate-early gene expression in replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1 but not by mutation of the virion host shutoff function, *J Virol* **68** (10), 6347-62.

- Jordan, R. und P.A. Schaffer (1997). Activation of gene expression by herpes simplex virus type 1 ICPO occurs at the level of mRNA synthesis, *J Virol* **71** (9), 6850-62.
- Kaech, S.M. und R. Ahmed (2001). Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells, *Nat Immunol* **2** (5), 415-22.
- Kappler, J.W., B. Skidmore, J. White und P. Marrack (1981). Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition, *J Exp Med* **153** (5), 1198-214.
- Kaufmann, S.H. (1988). *Listeria monocytogenes* specific T-cell lines and clones, *Infection* **16** (Suppl 2), S128-36.
- Kaufmann, S.H. (1993). Immunity to intracellular bacteria, *Annu Rev Immunol* **11**, 129-63.
- Kearney, E.R., K.A. Pape, D.Y. Loh und M.K. Jenkins (1994). Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo, *Immunity* **1** (4), 327-39.
- Kedl, R.M. und M.F. Mescher (1998). Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8+ T cell response, *J Immunol* **161** (2), 674-83.
- Kedl, R.M., W.A. Rees, D.A. Hildeman, B. Schaefer, T. Mitchell, J. Kappler und P. Marrack (2000). T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells, *J Exp Med* **192** (8), 1105-13.
- Kim, J.J., K.A. Simbiri, J.I. Sin, K. Dang, J. Oh, T. Dentchev, D. Lee, L.K. Nottingham, A.A. Chalian, D. McCallus, *et al.* (1999). Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV, *J Interferon Cytokine Res* **19** (1), 77-84.
- Kim, J.J., N.N. Trivedi, L.K. Nottingham, L. Morrison, A. Tsai, Y. Hu, S. Mahalingam, K. Dang, L. Ahn, N.K. Doyle, *et al.* (1998). Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens, *Eur J Immunol* **28** (3), 1089-103.
- Kirberg, J., A. Berns und H. von Boehmer (1997). Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules, *J Exp Med* **186** (8), 1269-75.
- Klein, M. (2001). Current progress in the development of human immunodeficiency virus vaccines: research and clinical trials, *Vaccine* **19** (17-19), 2210-5.
- Klinman, D.M., J.M. Sechler, J. Conover, M. Gu und A.S. Rosenberg (1998). Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory, *J Immunol* **160** (5), 2388-92.

- Klinman, D.M., A.K. Yi, S.L. Beaucage, J. Conover und A.M. Krieg (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (7), 2879-83.
- Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon und P. Cossart (1992). L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein, *Cell* **68** (3), 521-31.
- Kouskoff, V., H.J. Fehling, M. Lemeur, C. Benoist und D. Mathis (1993). A vector driving the expression of foreign cDNAs in the MHC class II-positive cells of transgenic mice, *J Immunol Methods* **166** (2), 287-91.
- Kovacsovic-Bankowski, M., K. Clark, B. Benacerraf und K.L. Rock (1993). Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (11), 4942-6.
- Krieg, A.M., A.K. Yi, S. Matson, T.J. Waldschmidt, G.A. Bishop, R. Teasdale, G.A. Koretzky und D.M. Klinman (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation, *Nature* **374** (6522), 546-9.
- Krisky, D.M., P.C. Marconi, T. Oligino, R.J. Rouse, D.J. Fink und J.C. Glorioso (1997). Rapid method for construction of recombinant HSV gene transfer vectors, *Gene Ther* **4** (10), 1120-5.
- Krisky, D.M., D. Wolfe, W.F. Goins, P.C. Marconi, R. Ramakrishnan, M. Mata, R.J. Rouse, D.J. Fink und J.C. Glorioso (1998). Deletion of multiple immediate-early genes from herpes simplex virus reduces cytotoxicity and permits long-term gene expression in neurons, *Gene Ther* **5** (12), 1593-603.
- Krug, A., G.D. Luker, W. Barchet, D.A. Leib, S. Akira und M. Colonna (2004). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9, *Blood* **103** (4), 1433-7. Epub 2003 Oct 16.
- Kruse, M., O. Rosorius, F. Kratzer, G. Stelz, C. Kuhnt, G. Schuler, J. Hauber und A. Steinkasserer (2000). Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity, *J Virol* **74** (15), 7127-36.
- Kuhn, M. und W. Goebel (1989). Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells, *Infect Immun* **57** (1), 55-61.
- Kumaraguru, U., R.J. Rouse, S.K. Nair, B.D. Bruce und B.T. Rouse (2000). Involvement of an ATP-dependent peptide chaperone in cross-presentation after DNA immunization, *J Immunol* **165** (2), 750-9.
- Kwong, A.D., J.A. Kruper und N. Frenkel (1988). Herpes simplex virus virion host shutoff function, *J Virol* **62** (3), 912-21.

- Ladel, C.H., I.E. Flesch, J. Arnoldi und S.H. Kaufmann (1994). Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection, *J Immunol* **153** (7), 3116-22.
- Lane, F.C. und E.R. Unanue (1972). Requirement of thymus (T) lymphocytes for resistance to listeriosis, *J Exp Med* **135** (5), 1104-12.
- Latchman, D.S. (2001). Gene delivery and gene therapy with herpes simplex virus-based vectors, *Gene* **264** (1), 1-9.
- Latz, E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K.A. Fitzgerald, B.G. Monks, C.F. Knetter, E. Lien, N.J. Nilsen, T. Espevik und D.T. Golenbock (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome, *Nat Immunol* **5** (2), 190-8. Epub 2004 Jan 11.
- Le, T.P., K.M. Coonan, R.C. Hedstrom, Y. Charoenvit, M. Sedegah, J.E. Epstein, S. Kumar, R. Wang, D.L. Doolan, J.D. Maguire, *et al.* (2000). Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers, *Vaccine* **18** (18), 1893-901.
- Lepay, D.A., R.M. Steinman, C.F. Nathan, H.W. Murray und Z.A. Cohn (1985). Liver macrophages in murine listeriosis. Cell-mediated immunity is correlated with an influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates, *J Exp Med* **161** (6), 1503-12.
- Levin, D., S. Constant, T. Pasqualini, R. Flavell und K. Bottomly (1993). Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen in vivo, *J Immunol* **151** (12), 6742-50.
- Lewis, P.J., G.J. Cox, S. van Drunen Littel-van den Hurk und L.A. Babiuk (1997). Polynucleotide vaccines in animals: enhancing and modulating responses, *Vaccine* **15** (8), 861-4.
- Lewis, P.J., H. van Drunen Littel-van den und L.A. Babiuk (1999). Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response, *J Virol* **73** (12), 10214-23.
- Li, M., G.M. Davey, R.M. Sutherland, C. Kurts, A.M. Lew, C. Hirst, F.R. Carbone und W.R. Heath (2001). Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo, *J Immunol* **166** (10), 6099-103.
- Liu, N., N. Ohnishi, L. Ni, S. Akira und K.B. Bacon (2003). CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells, *Nat Immunol* **4** (7), 687-93.
- Lowenstein, P.R., S. Fournel, D. Bain, P. Tomasec, P. Clissold, M.G. Castro und A.L. Epstein (1994). Herpes simplex virus 1 (HSV-1) helper co-infection affects the distribution of an amplicon encoded protein in glia, *Neuroreport* **5** (13), 1625-30.

Ludewig, B., S. Ehl, U. Karrer, B. Odermatt, H. Hengartner und R.M. Zinkernagel (1998). Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity, *J Virol* **72** (5), 3812-8.

Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov und A. Iwasaki (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells, *J Exp Med* **198** (3), 513-20.

MacDonald, T.T. und P.B. Carter (1980). Cell-mediated immunity to intestinal infection, *Infect Immun* **28** (2), 516-23.

MacGregor, R.R., J.D. Boyer, R.B. Ciccarelli, R.S. Ginsberg und D.B. Weiner (2000). Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow-up data, *J Infect Dis* **181** (1), 406.

MacGregor, R.R., J.D. Boyer, K.E. Ugen, K.E. Lacy, S.J. Gluckman, M.L. Bagarazzi, M.A. Chattergoon, Y. Baine, T.J. Higgins, R.B. Ciccarelli, *et al.* (1998). First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response, *J Infect Dis* **178** (1), 92-100.

Mackness, G.B. (1969). The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo, *J Exp Med* **129** (5), 973-92.

Mackay, C.R., D.P. Andrew, M. Briskin, D.J. Ringler und E.C. Butcher (1996). Phenotype, and migration properties of three major subsets of tissue homing T cells in sheep, *Eur J Immunol* **26** (10), 2433-9.

MacLennan, I.C., C. Garcia de Vinuesa und M. Casamayor-Palleja (2000). B-cell memory and the persistence of antibody responses, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355** (1395), 345-50.

Maecker, H.T., D.T. Umetsu, R.H. DeKruyff und S. Levy (1997). DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumin, *Vaccine* **15** (15), 1687-96.

Maini, M.K., N. Gudgeon, L.R. Wedderburn, A.B. Rickinson und P.C. Beverley (2000). Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype, *J Immunol* **165** (10), 5729-37.

Manickan, E., R.J. Rouse, Z. Yu, W.S. Wire und B.T. Rouse (1995). Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4+ T lymphocytes, *J Immunol* **155** (1), 259-65.

Marzo, A.L., R.A. Lake, B.W. Robinson und B. Scott (1999). T-cell receptor transgenic analysis of tumor-specific CD8 and CD4 responses in the eradication of solid tumors, *Cancer Res* **59** (5), 1071-9.

Matis, J. und M. Kudelova (2001). Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses, *Acta Virol* **45** (5-6), 269-77.

- Matzinger, P. (1998). An innate sense of danger, *Semin Immunol* **10** (5), 399-415.
- McConkey, S.J., W.H. Reece, V.S. Moorthy, D. Webster, S. Dunachie, G. Butcher, J.M. Vuola, T.J. Blanchard, P. Gothard, K. Watkins, *et al.* (2003). Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans, *Nat Med* **9** (6), 729-35.
- McShane, H., R. Brookes, S.C. Gilbert und A.V. Hill (2001). Enhanced immunogenicity of CD4(+) t-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis, *Infect Immun* **69** (2), 681-6.
- Mellerick, D.M. und N.W. Fraser (1987). Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state, *Virology* **158** (2), 265-75.
- Mercado, R., S. Vijh, S.E. Allen, K. Kerksiek, I.M. Pilip und E.G. Pamer (2000). Early programming of T cell populations responding to bacterial infection, *J Immunol* **165** (12), 6833-9.
- Mikloska, Z., L. Bosnjak und A.L. Cunningham (2001). Immature monocyte-derived dendritic cells are productively infected with herpes simplex virus type 1, *J Virol* **75** (13), 5958-64.
- Mittrucker, H.W., A. Kohler und S.H. Kaufmann (2000). Substantial in vivo proliferation of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes during secondary *Listeria monocytogenes* infection, *Eur J Immunol* **30** (4), 1053-9.
- Mizuki, M., A. Nakane, K. Sekikawa, Y.I. Tagawa und Y. Iwakura (2002). Comparison of host resistance to primary and secondary *Listeria monocytogenes* infections in mice by intranasal and intravenous routes, *Infect Immun* **70** (9), 4805-11.
- Mohamadzadeh, M., H. Jonuleit, G. Kolde, A. Pavlidou, E. Schmitt und J. Knop (1993). Functional and morphological characterization of 4F7+ spleen accessory dendritic cells, *Int Immunol* **5** (6), 615-24.
- Mommaas, A.M., A.A. Mulder, R. Jordens, C. Out, M.C. Tan, P. Cresswell, P.M. Kluin und F. Koning (1999). Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules, *Eur J Immunol* **29** (2), 571-80.
- Morrison, E.E., A.J. Stevenson, Y.F. Wang und D.M. Meredith (1998). Differences in the intracellular localization and fate of herpes simplex virus tegument proteins early in the infection of Vero cells, *J Gen Virol* **79** (Pt 10), 2517-28.
- Morrison, L.A. und D.M. Knipe (1994). Immunization with replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1: sites of immune intervention in pathogenesis of challenge virus infection, *J Virol* **68** (2), 689-96.

Morrison, L.A. und D.M. Knipe (1996). Mechanisms of immunization with a replication-defective mutant of herpes simplex virus 1, *Virology* **220** (2), 402-13.

Morrison, L.A., L. Zhu und L.G. Thebeau (2001). Vaccine-induced serum immunoglobulin contributes to protection from herpes simplex virus type 2 genital infection in the presence of immune T cells, *J Virol* **75** (3), 1195-204.

Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin und R.L. Coffman (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *J Immunol* **136** (7), 2348-57.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51** (Pt 1), 263-73.

Murali-Krishna, K., J.D. Altman, M. Suresh, D.J. Sourdive, A.J. Zajac, J.D. Miller, J. Slansky und R. Ahmed (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection, *Immunity* **8** (2), 177-87.

Murali-Krishna, K., L.L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman und R. Ahmed (1999). Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice, *Science* **286** (5443), 1377-81.

Murphy, C.G., W.T. Lucas, R.E. Means, S. Czajak, C.L. Hale, J.D. Lifson, A. Kaur, R.P. Johnson, D.M. Knipe und R.C. Desrosiers (2000). Vaccine protection against simian immunodeficiency virus by recombinant strains of herpes simplex virus, *J Virol* **74** (17), 7745-54.

Nakane, A., T. Minagawa und K. Kato (1988). Endogenous tumor necrosis factor (cachectin) is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes* infection, *Infect Immun* **56** (10), 2563-9.

Ngo, V.N., H.L. Tang und J.G. Cyster (1998). Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells, *J Exp Med* **188** (1), 181-91.

Norbury, C.C., B.J. Chambers, A.R. Prescott, H.G. Ljunggren und C. Watts (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells, *Eur J Immunol* **27** (1), 280-8.

North, R.J. (1973). Cellular mediators of anti-*Listeria* immunity as an enlarged population of short lived, replicating T cells. Kinetics of their production, *J Exp Med* **138** (2), 342-55.

North, R.J. und J.F. Deissler (1975). Nature of "memory" in T-cell mediated antibacterial immunity: cellular parameters that distinguish between the active immune response and a state of "memory", *Infect Immun* **12** (4), 761-7.

- Ogg, G.S. und A.J. McMichael (1998). HLA-peptide tetrameric complexes, *Curr Opin Immunol* **10** (4), 393-6.
- Olschowka, J.A., W.J. Bowers, S.D. Hurley, M.A. Mastrangelo und H.J. Federoff (2003). Helper-free HSV-1 amplicons elicit a markedly less robust innate immune response in the CNS, *Mol Ther* **7** (2), 218-27.
- Pape, K.A., E.R. Kearney, A. Khoruts, A. Mondino, R. Merica, Z.M. Chen, E. Ingulli, J. White, J.G. Johnson und M.K. Jenkins (1997). Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo, *Immunol Rev* **156** 67-78.
- Pertmer, T.M., T.R. Roberts und J.R. Haynes (1996). Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery, *J Virol* **70** (9), 6119-25.
- Pope, C., S.K. Kim, A. Marzo, D. Masopust, K. Williams, J. Jiang, H. Shen und L. Lefrancois (2001). Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection, *J Immunol* **166** (5), 3402-9.
- Porgador, A., K.R. Irvine, A. Iwasaki, B.H. Barber, N.P. Restifo und R.N. Germain (1998). Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization, *J Exp Med* **188** (6), 1075-82.
- Prayaga, S.K., M.J. Ford und J.R. Haynes (1997). Manipulation of HIV-1 gp120-specific immune responses elicited via gene gun-based DNA immunization, *Vaccine* **15** (12-13), 1349-52.
- Preston, C.M. und M.J. Nicholl (1997). Repression of gene expression upon infection of cells with herpes simplex virus type 1 mutants impaired for immediate-early protein synthesis, *J Virol* **71** (10), 7807-13.
- Racz, P., K. Tenner und E. Mero (1972). Experimental *Listeria enteritis*. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental listeria infection, *Lab Invest* **26** (6), 694-700.
- Raz, E., D.A. Carson, S.E. Parker, T.B. Parr, A.M. Abai, G. Aichinger, S.H. Gromkowski, M. Singh, D. Lew, M.A. Yankauckas und et al. (1994). Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses, *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (20), 9519-23.
- Razin, A. und J. Friedman (1981). DNA methylation and its possible biological roles, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **25** 33-52.
- Reeves, J.P.R., P. A. (2001). Care and Handling of Laboratory Animals. In *Current Protocols in Immunology*, Coligan, J. E. K., A. M.; Margulies, D. H.; Shevach, E. M., Strober, W, ed. (Edison, John Wiley & Sons, Inc.).

Reinhardt, R.L., A. Khoruts, R. Merica, T. Zell und M.K. Jenkins (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body, *Nature* **410** (6824), 101-5.

Reis e Sousa, C., P.D. Stahl und J.M. Austyn (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro, *J Exp Med* **178** (2), 509-19.

Robinson, H.L., L.A. Hunt und R.G. Webster (1993). Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA, *Vaccine* **11** (9), 957-60.

Rock, D.L., A.B. Nesburn, H. Ghiasi, J. Ong, T.L. Lewis, J.R. Lokensgard und S.L. Wechsler (1987). Detection of latency-related viral RNAs in trigeminal ganglia of rabbits latently infected with herpes simplex virus type 1, *J Virol* **61** (12), 3820-6.

Rogers, P.R. und M. Croft (1999). Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance, *J Immunol* **163** (3), 1205-13.

Rogers, P.R., C. Dubey und S.L. Swain (2000). Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen, *J Immunol* **164** (5), 2338-46.

Roizman, B. (1996). The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (21), 11307-12.

Roizman, B. u. S., A. E. (1996). In *Fields Virology*, Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P., Chanock, R. M., Hirsch, M. S., Melnick, J. L., Monath, T. P. und Roizman, B., ed. (Philadelphia, Lippincott-Raven), pp. 2231-2295.

Rolph, M.S. und S.H. Kaufmann (2001). CD40 signaling converts a minimally immunogenic antigen into a potent vaccine against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*, *J Immunol* **166** (8), 5115-21.

Rosen, H., S. Gordon und R.J. North (1989). Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for the type 3 complement receptor of myelomonocytic cells. Absence of monocytes at infective foci allows *Listeria* to multiply in nonphagocytic cells, *J Exp Med* **170** (1), 27-37.

Rosenthal, A.S. und E.M. Shevach (1973). Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes, *J Exp Med* **138** (5), 1194-212.

Roy, M.J., M.S. Wu, L.J. Barr, J.T. Fuller, L.G. Tussey, S. Speller, J. Culp, J.K. Burkholder, W.F. Swain, R.M. Dixon, *et al.* (2000). Induction of antigen-specific CD8+ T cells, T helper cells, and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccine, *Vaccine* **19** (7-8), 764-78.

- Rush, C., T. Mitchell und P. Garside (2002). Efficient priming of CD4+ and CD8+ T cells by DNA vaccination depends on appropriate targeting of sufficient levels of immunologically relevant antigen to appropriate processing pathways, *J Immunol* **169** (9), 4951-60.
- Sacks, W.R., C.C. Greene, D.P. Aschman und P.A. Schaffer (1985). Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein, *J Virol* **55** (3), 796-805.
- Saeki, Y., C. Fraefel, T. Ichikawa, X.O. Breakefield und E.A. Chiocca (2001). Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome, *Mol Ther* **3** (4), 591-601.
- Saeki, Y., T. Ichikawa, A. Saeki, E.A. Chiocca, K. Tobler, M. Ackermann, X.O. Breakefield und C. Fraefel (1998). Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors, *Hum Gene Ther* **9** (18), 2787-94.
- Safley, S.A., C.W. Cluff, N.E. Marshall und H.K. Ziegler (1991). Role of listeriolysin-O (LLO) in the T lymphocyte response to infection with *Listeria monocytogenes*. Identification of T cell epitopes of LLO, *J Immunol* **146** (10), 3604-16.
- Salio, M., M. Cella, M. Suter und A. Lanzavecchia (1999). Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus, *Eur J Immunol* **29** (10), 3245-53.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli und A. Lanzavecchia (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products, *J Exp Med* **182** (2), 389-400.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp und A. Lanzavecchia (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions, *Nature* **401** (6754), 708-12.
- Salomon, B., J.L. Cohen, C. Masurier und D. Klatzmann (1998). Three populations of mouse lymph node dendritic cells with different origins and dynamics, *J Immunol* **160** (2), 708-17.
- Samady, L., E. Costigliola, L. MacCormac, Y. McGrath, S. Cleverley, C.E. Lilley, J. Smith, D.S. Latchman, B. Chain und R.S. Coffin (2003). Deletion of the virion host shutoff protein (vhs) from herpes simplex virus (HSV) relieves the viral block to dendritic cell activation: potential of vhs- HSV vectors for dendritic cell-mediated immunotherapy, *J Virol* **77** (6), 3768-76.
- Samaniego, L.A., L. Neiderhiser und N.A. DeLuca (1998). Persistence and expression of the herpes simplex virus genome in the absence of immediate-early proteins, *J Virol* **72** (4), 3307-20.

- Samaniego, L.A., N. Wu und N.A. DeLuca (1997). The herpes simplex virus immediate-early protein ICP0 affects transcription from the viral genome and infected-cell survival in the absence of ICP4 and ICP27, *J Virol* **71** (6), 4614-25.
- Sambrook, J.F., E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. In Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sato, Y., M. Roman, H. Tighe, D. Lee, M. Corr, M.D. Nguyen, G.J. Silverman, M. Lotz, D.A. Carson und E. Raz (1996). Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization, *Science* **273** (5273), 352-4.
- Schlech, W.F., 3rd, P.M. Lavigne, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A.J. Wort, A.W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls und C.V. Broome (1983). Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food, *N Engl J Med* **308** (4), 203-6.
- Schluter, D., S.B. Oprisiu, S. Chahoud, D. Weiner, O.D. Wiestler, H. Hof und M. Deckert-Schluter (1995). Systemic immunization induces protective CD4+ and CD8+ T cell-mediated immune responses in murine *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis, *Eur J Immunol* **25** (8), 2384-91.
- Schulick, A.H., G. Vassalli, P.F. Dunn, G. Dong, J.J. Rade, C. Zamarron und D.A. Dichek (1997). Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat carotid arteries. Potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity, *J Clin Invest* **99** (2), 209-19.
- Seder, R.A. und A.V. Hill (2000). Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity, *Nature* **406** (6797), 793-8.
- Serody, J.S., R.M. Poston, D. Weinstock, R.J. Kurlander und J.A. Frelinger (1996). CD4+ cytolytic effectors are inefficient in the clearance of *Listeria monocytogenes*, *Immunology* **88** (4), 544-50.
- Shedlock, D.J., J.K. Whitmire, J. Tan, A.S. MacDonald, R. Ahmed und H. Shen (2003). Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection, *J Immunol* **170** (4), 2053-63.
- Shen, H., J.F. Miller, X. Fan, D. Kolwyck, R. Ahmed und J.T. Harty (1998a). Compartmentalization of bacterial antigens: differential effects on priming of CD8 T cells and protective immunity, *Cell* **92** (4), 535-45.
- Shen, H., M.K. Slifka, M. Matloubian, E.R. Jensen, R. Ahmed und J.F. Miller (1995). Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle for the induction of protective anti-viral cell-mediated immunity, *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (9), 3987-91.
- Shen, H., C.M. Tato und X. Fan (1998b). *Listeria monocytogenes* as a probe to study cell-mediated immunity, *Curr Opin Immunol* **10** (4), 450-8.

- Shen, H., J.K. Whitmire, X. Fan, D.J. Shedlock, S.M. Kaech und R. Ahmed (2003). A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes*, *J Immunol* **170** (3), 1443-51.
- Shen, Z., G. Reznikoff, G. Dranoff und K.L. Rock (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules, *J Immunol* **158** (6), 2723-30.
- Shortman, K. und Y.J. Liu (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes, *Nat Rev Immunol* **2** (3), 151-61.
- Smibert, C.A., D.C. Johnson und J.R. Smiley (1992). Identification and characterization of the virion-induced host shutoff product of herpes simplex virus gene UL41, *J Gen Virol* **73** (Pt 2), 467-70.
- Smith, D.K., R. Dudani, J.A. Pedras-Vasconcelos, Y. Chapdelaine, H. van Faassen und S. Sad (2002). Cross-reactive antigen is required to prevent erosion of established T cell memory and tumor immunity: a heterologous bacterial model of attrition, *J Immunol* **169** (3), 1197-206.
- Smith, G.A., H. Marquis, S. Jones, N.C. Johnston, D.A. Portnoy und H. Goldfine (1995). The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread, *Infect Immun* **63** (11), 4231-7.
- Smith, G.A., J.A. Theriot und D.A. Portnoy (1996). The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin, *J Cell Biol* **135** (3), 647-60.
- Song, W., H.L. Kong, H. Carpenter, H. Torii, R. Granstein, S. Rafii, M.A. Moore und R.G. Crystal (1997). Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity, *J Exp Med* **186** (8), 1247-56.
- Spaete, R.R. und N. Frenkel (1982). The herpes simplex virus amplicon: a new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector, *Cell* **30** (1), 295-304.
- Sparwasser, T., T. Miethke, G. Lipford, A. Erdmann, H. Hacker, K. Heeg und H. Wagner (1997). Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock, *Eur J Immunol* **27** (7), 1671-9.
- Sprecher, E. und Y. Becker (1987). Herpes simplex virus type 1 pathogenicity in footpad and ear skin of mice depends on Langerhans cell density, mouse genetics, and virus strain, *J Virol* **61** (8), 2515-22.
- Sprecher, E. und Y. Becker (1988). Role of epidermal Langerhans cells in viral infections, *Arch Virol* **103** (1-2), 1-14.

- Sprecher, E. und Y. Becker (1989). Langerhans cell density and activity in mouse skin and lymph nodes affect herpes simplex type 1 (HSV-1) pathogenicity, *Arch Virol* **107** (3-4), 191-205.
- Stacey, K.J., M.J. Sweet und D.A. Hume (1996). Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA, *J Immunol* **157** (5), 2116-22.
- Stanberry, L.R., A.L. Cunningham, A. Mindel, L.L. Scott, S.L. Spruance, F.Y. Aoki und C.J. Lacey (2000). Prospects for control of herpes simplex virus disease through immunization, *Clin Infect Dis* **30** (3), 549-66.
- Stavropoulos, T.A. und C.A. Strathdee (1998). An enhanced packaging system for helper-dependent herpes simplex virus vectors, *J Virol* **72** (9), 7137-43.
- Stenger, S. und R.L. Modlin (1998). Cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens, *Curr Opin Immunol* **10** (4), 471-7.
- Stephan, R.N., T.S. Kupper, A.S. Geha, A.E. Baue und I.H. Chaudry (1987). Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis, *Arch Surg* **122** (1), 62-8.
- Stevens, J.G., E.K. Wagner, G.B. Devi-Rao, M.L. Cook und L.T. Feldman (1987). RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons, *Science* **235** (4792), 1056-9.
- Swain, S.L., H. Hu und G. Huston (1999). Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors, *Science* **286** (5443), 1381-3.
- Tan, M.C., A.M. Mommaas, J.W. Drijfhout, R. Jordens, J.J. Onderwater, D. Verwoerd, A.A. Mulder, A.N. van der Heiden, D. Scheidegger, L.C. Oomen, *et al.* (1997). Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells, *Eur J Immunol* **27** (9), 2426-35.
- Tang, D.C., M. DeVit und S.A. Johnston (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response, *Nature* **356** (6365), 152-4.
- Tanghe, A., S. D'Souza, V. Rosseels, O. Denis, T.H. Ottenhoff, W. Dalemans, C. Wheeler und K. Huygen (2001). Improved immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85 by protein boosting, *Infect Immun* **69** (5), 3041-7.
- Thomas, C.E., A. Ehrhardt und M.A. Kay (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy, *Nat Rev Genet* **4** (5), 346-58.
- Thompson, C.B. (1995). Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation?, *Cell* **81** (7), 979-82.

- Tokui, M., I. Takei, F. Tashiro, A. Shimada, A. Kasuga, M. Ishii, T. Ishii, K. Takatsu, T. Saruta und J. Miyazaki (1997). Intramuscular injection of expression plasmid DNA is an effective means of long-term systemic delivery of interleukin-5, *Biochem Biophys Res Commun* **233** (2), 527-31.
- Tolba, K.A., W.J. Bowers, D.J. Eling, A.E. Casey, T.J. Kipps, H.J. Federoff und J.D. Rosenblatt (2002a). HSV amplicon-mediated delivery of LIGHT enhances the antigen-presenting capacity of chronic lymphocytic leukemia, *Mol Ther* **6** (4), 455-63.
- Tolba, K.A., W.J. Bowers, S.P. Hilchey, M.W. Halterman, D.F. Howard, R.E. Giuliano, H.J. Federoff und J.D. Rosenblatt (2001). Development of herpes simplex virus-1 amplicon-based immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia, *Blood* **98** (2), 287-95.
- Tolba, K.A., W.J. Bowers, J. Muller, V. Houseknecht, R.E. Giuliano, H.J. Federoff und J.D. Rosenblatt (2002b). Herpes simplex virus (HSV) amplicon-mediated codelivery of secondary lymphoid tissue chemokine and CD40L results in augmented antitumor activity, *Cancer Res* **62** (22), 6545-51.
- Torres, C.A., A. Iwasaki, B.H. Barber und H.L. Robinson (1997). Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations, *J Immunol* **158** (10), 4529-32.
- Torres, C.A., K. Yang, F. Mustafa und H.L. Robinson (1999). DNA immunization: effect of secretion of DNA-expressed hemagglutinins on antibody responses, *Vaccine* **18** (9-10), 805-14.
- Ulmer, J.B., R.R. Deck, C.M. Dewitt, J.I. Donnelly und M.A. Liu (1996). Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells, *Immunology* **89** (1), 59-67.
- Ulmer, J.B., R.R. Deck, C.M. DeWitt, A. Friedman, J.J. Donnelly und M.A. Liu (1994). Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines, *Vaccine* **12** (16), 1541-4.
- Ulmer, J.B., J.J. Donnelly, S.E. Parker, G.H. Rhodes, P.L. Felgner, V.J. Dwarki, S.H. Gromkowski, R.R. Deck, C.M. DeWitt, A. Friedman und et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein, *Science* **259** (5102), 1745-9.
- Ulmer, J.B., T.M. Fu, R.R. Deck, A. Friedman, L. Guan, C. DeWitt, X. Liu, S. Wang, M.A. Liu, J.J. Donnelly und M.J. Caulfield (1998). Protective CD4⁺ and CD8⁺ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA, *J Virol* **72** (7), 5648-53.
- Unanue, E.R. (1984). Antigen-presenting function of the macrophage, *Annu Rev Immunol* **2** 395-428.
- Unanue, E.R. (1997). Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response, *Immunol Rev* **158** 11-25.

Underhill, D.M. und A. Ozinsky (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection, *Curr Opin Immunol* **14** (1), 103-10.

van Leeuwen, H., M. Okuwaki, R. Hong, D. Chakravarti, K. Nagata und P. O'Hare (2003). Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 interacts with TAF-I proteins and inhibits nucleosome assembly but not regulation of histone acetylation by INHAT, *J Gen Virol* **84** (Pt 9), 2501-10.

van Mierlo, G.J., A.T. den Boer, J.P. Medema, E.I. van der Voort, M.F. Fransen, R. Offringa, C.J. Melief und R.E. Toes (2002). CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(-) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (8), 5561-6.

van Stipdonk, M.J., E.E. Lemmens und S.P. Schoenberger (2001). Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation, *Nat Immunol* **2** (5), 423-9.

Veiga-Fernandes, H., U. Walter, C. Bourgeois, A. McLean und B. Rocha (2000). Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo, *Nat Immunol* **1** (1), 47-53.

Vijh, S. und E.G. Pamer (1997). Immunodominant and subdominant CTL responses to *Listeria monocytogenes* infection, *J Immunol* **158** (7), 3366-71.

Viret, C., F.S. Wong und C.A. Janeway, Jr. (1999). Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition, *Immunity* **10** (5), 559-68.

Wade-Martins, R., Y. Saeki und E. Antonio Chiocca (2003). Infectious delivery of a 135-kb LDLR genomic locus leads to regulated complementation of low-density lipoprotein receptor deficiency in human cells, *Mol Ther* **7** (5), 604-12.

Wade-Martins, R., E.R. Smith, E. Tyminski, E.A. Chiocca und Y. Saeki (2001). An infectious transfer and expression system for genomic DNA loci in human and mouse cells, *Nat Biotechnol* **19** (11), 1067-70.

Wakimoto, H., P.R. Johnson, D.M. Knipe und E.A. Chiocca (2003). Effects of innate immunity on herpes simplex virus and its ability to kill tumor cells, *Gene Ther* **10** (11), 983-90.

Wallace, R.B., J. Shaffer, R.F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose und K. Itakura (1979). Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch, *Nucleic Acids Res* **6** (11), 3543-57.

Wang, R., J. Epstein, F.M. Baraceros, E.J. Gorak, Y. Charoenvit, D.J. Carucci, R.C. Hedstrom, N. Rahardjo, T. Gay, P. Hobart, *et al.* (2001). Induction of CD4(+) T cell-dependent CD8(+) type 1 responses in humans by a malaria DNA vaccine, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (19), 10817-22.

- Weiss, R., S. Scheiblhofer, J. Freund, F. Ferreira, I. Livey und J. Thalhamer (2002). Gene gun bombardment with gold particles displays a particular Th2-promoting signal that overrules the Th1-inducing effect of immunostimulatory CpG motifs in DNA vaccines, *Vaccine* **20** (25-26), 3148-54.
- White, D.W., V.P. Badovinac, G. Kollias und J.T. Harty (2000). Cutting edge: antilisterial activity of CD8+ T cells derived from TNF-deficient and TNF/perforin double-deficient mice, *J Immunol* **165** (1), 5-9.
- Whitley, R.J. (1988). Herpes simplex virus infections of the central nervous system. A review, *Am J Med* **85** (2A), 61-7.
- Williams, R.S., S.A. Johnston, M. Riedy, M.J. DeVit, S.G. McElligott und J.C. Sanford (1991). Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles, *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (7), 2726-30.
- Willis, R.A., W.J. Bowers, M.J. Turner, T.L. Fisher, C.S. Abdul-Alim, D.F. Howard, H.J. Federoff, E.M. Lord und J.G. Frelinger (2001). Dendritic cells transduced with HSV-1 amplicons expressing prostate-specific antigen generate antitumor immunity in mice, *Hum Gene Ther* **12** (15), 1867-79.
- Witherden, D., N. van Oers, C. Waltzinger, A. Weiss, C. Benoist und D. Mathis (2000). Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules, *J Exp Med* **191** (2), 355-64.
- Wolff, J.A., R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani und P.L. Felgner (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo, *Science* **247** (4949 Pt 1), 1465-8.
- Wolff, J.A., P. Williams, G. Acsadi, S. Jiao, A. Jani und W. Chong (1991). Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo, *Biotechniques* **11** (4), 474-85.
- Wong, P. und E.G. Pamer (2003). CD8 T cell responses to infectious pathogens, *Annu Rev Immunol* **21** 29-70.
- Wood, M.J., A.P. Byrnes, D.W. Pfaff, S.D. Rabkin und H.M. Charlton (1994). Inflammatory effects of gene transfer into the CNS with defective HSV-1 vectors, *Gene Ther* **1** (5), 283-91.
- Wu, N., S.C. Watkins, P.A. Schaffer und N.A. DeLuca (1996). Prolonged gene expression and cell survival after infection by a herpes simplex virus mutant defective in the immediate-early genes encoding ICP4, ICP27, and ICP22, *J Virol* **70** (9), 6358-69.
- Wuenschel, M.D., S. Kohler, A. Bubert, U. Gerike und W. Goebel (1993). The iap gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity, *J Bacteriol* **175** (11), 3491-501.

- Xiong, H., Y. Tanabe, S. Ohya und M. Mitsuyama (1998). Administration of killed bacteria together with listeriolysin O induces protective immunity against *Listeria monocytogenes* in mice, *Immunology* **94** (1), 14-21.
- Yang, N.S., J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell und D. McCabe (1990). In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment, *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (24), 9568-72.
- Yasukawa, M., A. Inatsuki und Y. Kobayashi (1988). Helper activity in antigen-specific antibody production mediated by CD4+ human cytotoxic T cell clones directed against herpes simplex virus, *J Immunol* **140** (10), 3419-25.
- Ye, G.J., K.T. Vaughan, R.B. Vallee und B. Roizman (2000). The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane, *J Virol* **74** (3), 1355-63.
- York, I.A., C. Roop, D.W. Andrews, S.R. Riddell, F.L. Graham und D.C. Johnson (1994). A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes, *Cell* **77** (4), 525-35.
- Yoshida, A., T. Nagata, M. Uchijima, T. Higashi und Y. Koide (2000). Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses, *Vaccine* **18** (17), 1725-9.
- Yoshida, A., T. Nagata, M. Uchijima und Y. Koide (2001). Protective CTL response is induced in the absence of CD4+ T cells and IFN-gamma by gene gun DNA vaccination with a minigene encoding a CTL epitope of *Listeria monocytogenes*, *Vaccine* **19** (30), 4297-306.
- Zapata-Sirvent, R.L., J.F. Hansbrough, M.C. Cox und W.H. Carter (1992). Immunologic alterations in a murine model of hemorrhagic shock, *Crit Care Med* **20** (4), 508-17.
- Zaupa, C., V. Revol-Guyot und A.L. Epstein (2003). Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes, *Hum Gene Ther* **14** (11), 1049-63.
- Zheng, B., S. Han und G. Kelsoe (1996). T helper cells in murine germinal centers are antigen-specific emigrants that downregulate Thy-1, *J Exp Med* **184** (3), 1083-91.
- Zhong, L., A. Granelli-Piperno, Y. Choi und R.M. Steinman (1999). Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells, *Eur J Immunol* **29** (3), 964-72.
- Zimmermann, C., A. Prevost-Blondel, C. Blaser und H. Pircher (1999). Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences, *Eur J Immunol* **29** (1), 284-90.

Zimmermann, S., O. Egeter, S. Hausmann, G.B. Lipford, M. Rocken, H. Wagner und K. Heeg (1998). CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis, *J Immunol* **160** (8), 3627-30.

Zinkernagel, R.M. (1974). Restriction by H-2 gene complex of transfer of cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes*, *Nature* **251** (5472), 230-3.

Zinkernagel, R.M. (1996). Immunology taught by viruses, *Science* **271** (5246), 173-8.

Zinkernagel, R.M. (2003). On natural and artificial vaccinations, *Annu Rev Immunol* **21** 515-46. Epub 2001 Dec 19.

Zinkernagel, R.M. und P.C. Doherty (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system, *Nature* **248** (450), 701-2.



9 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name	Henning Lauterbach
Geburtstag	15. Januar 1973
Geburtsort	Kassel
Nationalität	deutsch
Wohnort	Holzstr. 4, 80469 München

Schulbildung und Studium

Mai 1992	Abitur an der Albert-Schweitzer-Schule Hofgeismar
Oktober 1992 - Oktober 1995	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
Oktober 1994 - Juli 1995	Studium der Biologie an der Université Joseph-Fourier, Grenoble, Frankreich
Oktober 1995 - September 1999	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen Hauptfach: Molekulare Genetik Nebenfächer: Immunologie und Psychologie
August 1998 - September 1999	Diplomarbeit am Deutschen Primatenzentrum Göttingen, Abt. Prof. G. Hunsmann, Dr. H. Petry „Genotypische und Phänotypische Analyse von HIV-1 Primärisolaten“
Januar 2000 - März 2000	Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Immunbiologie und der Albert Ludwig Universität, Freiburg, Abt. Prof. T. Brocker
seit März 2000	Fortsetzung der Doktorarbeit am Institut für Immunologie, LMU München, Abt. Prof. T. Brocker

Veröffentlichungen

Lauterbach H., Kerksiek K.M., Busch D.H., Berto E., Bozac A., Mavromara P., Manservigi R., Epstein A.L., Marconi P. und Brocker T. (2004) Protection from bacterial infection by a single vaccination with replication-deficient Herpes Simplex Virus-1; **J Virol** **78** (8)

Lauterbach H., Epstein A.L., Marconi P. und Brocker T. (2004) Vaccination efficacy of Herpes Simplex Virus vectors in the presence of preexisting host immunity; *Manuskript eingereicht.*



10 DANKSAGUNG

Frau Prof. E. Weiß danke ich für die spontane Bereitschaft, die offizielle Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen und mir so die Prüfung an der Fakultät für Biologie der Universität München zu ermöglichen.

Herrn Prof. T. Brocker möchte ich für sein Vertrauen danken, mir eine Doktorandenstelle in seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt zu haben. Besonders dankbar bin ich für die Freiheit, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit gewährt wurde, ohne dabei auf eine sehr gute wissenschaftliche Betreuung verzichten zu müssen. Ich bin froh über die zahlreichen Möglichkeiten, die ich hatte, meine Daten auf internationalen Treffen und Kongressen zu präsentieren und Kontakte zu anderen Wissenschaftlern aufzubauen.

Meinen Mitarbeitern danke ich für die nette und entspannte Atmosphäre im Labor. Ohne sie wäre die Doktorandenzeit sicherlich weniger angenehm ausgefallen. Die verschiedenen Charaktere und Temperamente sorgten immer für Abwechslung und halfen mir in wissenschaftlicher und persönlicher Hinsicht, diese Zeit erfolgreich abzuschließen. Michael A. Cannarile, Melanie Werner und Petra Kleindienst möchte ich zudem für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Ohne Andrea Bol und Wolfgang Mertl wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich konnte mich jederzeit auf die exzellente Pflege meiner Versuchstiere verlassen. Andrea Bol möchte ich besonders für ihre Flexibilität danken, mir auch für kurzfristig geplante Experimente, die nötigen Tiere zu organisieren.

Frau Ursula Wolf danke ich für die zuverlässige Hilfe bei allen administrativen Angelegenheiten.

Herr Eugen Kopp half mir besonders am Anfang nach dem Umzug in das Institut für Immunologie, die dortigen Gegebenheiten kennenzulernen. Besonders seine langjährige Erfahrung erleichterte das Einrichten der neuen Laborräume.

Jenny danke ich für äußerst abwechslungsreiche Jahre, ihre Unterstützung sowie für viele schöne Momente. Durch ihr akribisches Lesen der Arbeit hat sie zudem entscheidend dazu

beitragen, sie möglichst fehlerfrei und übersichtlich zu gestalten. Ohne die freundliche Leihgabe eines Notebooks aus ihrer Arbeitsgruppe am Max-Planck-Institut für Neurobiologie hätte ich auch nicht die Möglichkeit gehabt, diese Arbeit zu Hause anzufertigen.

Meiner Familie danke ich ganz besonders für ihre stete Bereitschaft, mich in jeglicher Hinsicht zu unterstützen und mich auch in schwierigen Phasen zum Durchhalten zu ermuntern.