

Max Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin
und Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

**Vergleich von rekombinanten
Vaccinia- und DNA-Vektoren zur
Tumorimmuntherapie im
C57BL/6-Mausmodell**

vorgelegt von

Heiko Johnen

eingereicht im Juni 2001

an der Universität Potsdam

1. Gutachter:

Prof. Dr. B. Micheel, Universität Potsdam

weitere Gutachter:

PD Dr. M. Lipp

Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Berlin

Prof. Dr. V. Wunderlich

Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Berlin

Inhaltsverzeichnis

1	PROBLEMSTELLUNG	1
2	EINFÜHRUNG	3
2.1	TUMORANTIGENE	3
2.2	AN DER TUMORIMMUNITÄT BETEILIGTE EFFEKTORSYSTEME	7
2.3	TUMORIMMUNOTHERAPIE	11
2.4	DIE VEKTOREN PCI UND MVA	14
3	MATERIAL	17
3.1	BAKTERIEN	17
3.2	VEKTOREN	17
3.3	ZELLINIEN	17
3.4	MÄUSE	18
3.5	OLIGONUCLEOTIDE	18
3.6	ENZYME	18
3.7	ANTIKÖRPER UND KONJUGATE	18
3.8	CHEMIKALIEN, GERÄTE UND SONSTIGE MATERIALIEN	19
4	METHODEN	23
4.1	BAKTERIENKULTUREN	23
4.1.1	<i>Flüssigkulturen</i>	23
4.1.2	<i>Plattenkulturen</i>	23
4.1.3	<i>Lagerung</i>	23
4.2	KLONIERUNGEN	24
4.2.1	<i>Herstellung von chemokompetenten Bakterien</i>	24
4.2.2	<i>Herstellung von elektrokompenten Bakterien</i>	24
4.2.3	<i>Transformation chemokompetenter Bakterien</i>	24
4.2.4	<i>Transformation elektrokompenter Bakterien</i>	25
4.3	ISOLIERUNG VON DNA AUS BAKTERIEN	25
4.3.1	<i>Alkalischer Schnellaufschluß</i>	25
4.3.2	<i>Alkalischer Schnellaufschluß auf 96-Loch Mikrotiterplatten</i>	25
4.3.3	<i>Plasmidisolierung über alkalischen Aufschluß und Anionenaustauscher-Chromatographie</i>	26
4.4	PRÄPARATION UND ANALYSE VON DNA	26
4.4.1	<i>Elektrophoretische Auftrennung von DNA über Agarosegele</i>	26
4.4.2	<i>Isolierung von DNA aus Agarosegelen</i>	27
4.4.3	<i>Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion</i>	27
4.4.4	<i>Präzipitation von Nukleinsäuren mit Alkohol</i>	28
4.4.5	<i>Konzentrationsbestimmung</i>	28
4.5	ENZYMATISCHE REAKTIONEN AN DNA	28
4.5.1	<i>Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	28

4.5.2	<i>Abspaltung von 5'-Phosphatresten mit alkalischer Phosphatase</i>	29
4.5.3	<i>Auffüllen von 5'-überhängenden Enden mit Klenow-Polymerase</i>	29
4.5.4	<i>Abspaltung von 3'-überhängenden Enden mit T4-DNA-Polymerase</i>	30
4.5.5	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	30
4.6	SEQUENZIERUNG VON DNA	31
4.6.1	<i>Sequenzierung von DNA mit dem LICOR System</i>	31
4.6.2	<i>Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	31
4.7	KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN	32
4.7.1	<i>Zellkulturmedien und Zellvermehrung</i>	32
4.7.2	<i>Lagerung</i>	33
4.7.3	<i>Bestimmung des Anteils lebensfähiger Zellen</i>	33
4.8	PROTEINEXPRESSION IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN	33
4.8.1	<i>Transfektion durch die Kalziumphosphat-Methode</i>	33
4.8.2	<i>Liposomale Transfektion</i>	34
4.9	AUFTRENNUNG VON PROTEINEN IN POLYACRYLAMIDGELEN	34
4.10	NACHWEIS VON PROTEINEN DURCH WESTERN BLOT ANALYSE	35
4.10.1	<i>Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen</i>	35
4.10.2	<i>Immundetektion durch AP-konjugierte Antikörper</i>	35
4.10.3	<i>Immundetektion mit dem ECL-System</i>	36
4.11	PRÄPARATION PRIMÄREER EUKARYOTISCHER ZELLEN	36
4.11.1	<i>Präparation von embryonalen Hühnerfibroblasten (CEF)</i>	36
4.11.2	<i>Isolierung von humanen peripheren Blutlymphozyten (PBL)</i>	37
4.11.3	<i>Präparation von murinen Milzzellen</i>	37
4.12	AMPLIFIKATION UND KLONIERUNG REKOMBINANTER MVA-VIREN	38
4.12.1	<i>Amplifikation von Wildtyp und rekombinanten MVA</i>	38
4.12.2	<i>Sonifikation</i>	38
4.12.3	<i>Aufreinigung der MVA Viren</i>	39
4.12.4	<i>Bestimmung des Virustiters</i>	39
4.12.5	<i>Klonierung rekombinanter MVA Viren</i>	40
4.13	IN VITRO GENERIERUNG, REIFUNG UND INFEKTION VON DENDRITISCHEN ZELLEN	42
4.13.1	<i>Generierung humaner dendritischer Zellen aus Monozyten</i>	42
4.13.2	<i>Generierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark</i>	42
4.13.3	<i>Terminale Reifung dendritischer Zellen</i>	43
4.13.4	<i>Infektion der dendritischen Zellen</i>	43
4.14	DURCHFLUßZYTOMETRIE	44
4.14.1	<i>Nachweis von Oberflächenmarkern</i>	44
4.14.2	<i>Propidiumiodid-Färbung toter Zellen</i>	44
4.15	TIEREXPERIMENTE	45
4.16	ANALYSE DER IMMUNANTWORT	45
4.16.1	<i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)</i>	45
4.16.2	<i>Messung antigenspezifischer Zytotoxizität durch den Chrom-Freisetzungstest</i>	46

4.16.3	<i>Messung antigenspezifischer CTL durch intrazelluläre IFN-gamma Färbung</i>	47
4.17	SOFTWARE ZUR DATENVERARBEITUNG.....	49
5	ERGEBNISSE	51
5.1	KLONIERUNG UND ÜBERPRÜFUNG DER HERGESTELLTEN VEKTOREN.....	51
5.2	GENERIERUNG UND INFEKTION MURINER UND HUMANER DENDRITISCHER ZELLEN	56
5.2.1	<i>In Vitro Generierung von murinen und humanen dendritischen Zellen</i>	56
5.2.2	<i>Bestimmung der optimalen Infektionsbedingungen</i>	57
5.2.3	<i>Die terminale Reifung von infizierten und nicht-infizierten dendritischen Zellen</i>	60
5.3	IN VIVO VERGLEICH VON DNA, MVA UND MVA-INFIZIERTEN DENDRITISCHEN ZELLEN IM MC38 - C57BL/6 MODELL.....	61
5.3.1	<i>Induktion von langfristiger Tumorimmunität durch pCI-MUC1-DNA Vakzinierung</i>	62
5.3.2	<i>Induktion von Tumorimmunität durch pCI-CEA-DNA Vakzinierung</i>	63
5.3.3	<i>Induktion von Tumorimmunität durch MVA-MUC1 Vakzinierung</i>	64
5.3.4	<i>Induktion von Tumorimmunität durch eine therapeutische pCI-MUC1-DNA-Vakzinierung</i>	64
5.3.5	<i>Induktion von Tumorimmunität durch Vakzinierung mit MVA-MUC1 infizierten dendritischen Zellen</i>	66
5.3.6	<i>Ergänzende Experimente zum Einsatz von CD40Ligand-aktivierten APC zur Tumorimmuntherapie</i>	68
5.4	IN VIVO VERGLEICH DER DNA- UND MVA-VAKZINEN IM MCA205-BETA-GAL - C57BL/6 MODELL	70
5.5	ANALYSE DER ZELLULÄREN UND HUMORALEN IMMUNANTWORT	71
5.5.1	<i>Analyse der humoralen Antwort gegen Muzin und Vakzinia-Epitope</i>	71
5.5.2	<i>Nachweis Muzin-spezifischer CTL durch den Chrom-Freisetzungstest</i>	72
5.5.3	<i>Nachweis der zellulären Antwort durch intrazelluläre IFN-gamma-Färbung</i>	74
6	DISKUSSION	79
7	ZUSAMMENFASSUNG	97
8	SUMMARY	99
9	LITERATUR	101
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	111
11	DANKSAGUNG	115
12	LEBENS LAUF	117
13	ERKLÄRUNG	119
14	PUBLIKATIONEN	121
15	ANHANG	123

1 Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Vektoren auf der Basis von DNA und attenuierten Vakzinia Viren (*modified vaccinia virus Ankara*, MVA) kloniert und im C57BL/6-Maus-Tumormodell auf ihre Wirksamkeit hinsichtlich der Induktion von Immunität gegenüber Muzin1-exprimierenden Tumoren untersucht werden. Die erzielten Ergebnisse sollten in weiteren Tumormodellen unter Verwendung von Tumoren, die das karzinoembryonale Antigen (CEA) oder beta-Galactosidase exprimieren, überprüft werden. Ergänzend sollte die Eignung von MVA zur Entwicklung von Vakzinen auf der Basis von Virus-infizierten dendritischen Zellen untersucht werden.

Muzin ist ein stark glykosyliertes Transmembranprotein, das auf der luminalen Seite sekretorischer Epithelien (z.B. Brust, Lunge, Ovarien, Pankreas) exprimiert wird. Auf vielen Tumoren epithelialen Ursprungs ist Muzin bis zu 100-fach überexprimiert und möglicherweise aktiv an der Gewebeinvasion und Metastasierung der Tumorzellen beteiligt.

Das nicht-replikationskompetente MVA-Virus wurde bereits als Pockenimpfstoff an über 150 000 Individuen angewandt und kann daher als einer der sichersten viralen Vektoren für klinische Studien angesehen werden. MVA-Viren wurden in mehreren Studien zur Induktion von Immunität gegen virale und eukaryotische Pathogene in Mausmodellen erfolgreich eingesetzt.

Seit 1995 wurde in mehreren klinischen Studien gezeigt, daß auch Impfstoffe auf der Basis von Plasmid-DNA im Menschen sicher angewandt werden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein für DNA-Vakzinierungen geeigneter eukaryotischer Expressionsvektor als reine DNA-Vakzine und in Kombination mit MVA als Tumorstoff eingesetzt werden.

MVA und Plasmid-Vektoren zur Expression von Muzin, CEA bzw. beta-Galactosidase sollten kloniert werden und die korrekte Insertion und Expression durch Sequenzierung bzw. durchflußzytometrische Analyse und *Western blotting* unter Verwendung von transfizierten bzw. infizierten Zellen bestätigt werden. Für die Vakzinierungen sollten die Vektoren in ausreichender Menge und Reinheit hergestellt werden. Die Expression von Muzin auf *in vitro* generierten, mit rekombinanten MVA-Viren infizierten dendritischen Zellen sollte nachgewiesen werden, sowie die optimalen Bedingungen zur Infektion von dendritischen Zellen mit MVA ermittelt werden. Der Vergleich der Wirksamkeit der verschiedenen Vakzinen sollte durch Messung des

Tumorwachstums der Tumor-Zelllinien MC38-MUC1, MC38-CEA und MCA205-beta-Gal in vakzinierten C57BL/6 Mäusen, sowie durch die Analyse der induzierten humoralen und zellulären Immunantwort erfolgen. Insbesondere zytotoxische T-Zellen sind wahrscheinlich wesentlich an der Immunität gegen Tumore beteiligt. Daher sollte die durch die verschiedenen Vakzinierungsprotokolle induzierte zytotoxische T-Zell Antwort quantitativ nachgewiesen werden. Die Fortschritte bei der Identifizierung von Tumorantigenen und der Entwicklung von Gentransfer-Vektoren lassen hoffen, daß in Zukunft nicht nur Infektionskrankheiten, sondern auch Tumorerkrankungen durch rekombinante Impfstoffe bekämpft werden können. Welche der heute zur Verfügung stehenden Vektoren *in vivo* die wirksamsten und sichersten Tumorigen darstellten, ist jedoch noch nicht geklärt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen einen Beitrag für den Einsatz von DNA- bzw. MVA-Vektoren in weiteren „humanisierten“ Tiermodellen oder klinischen Studien darstellen.

2 Einführung

2.1 Tumorantigene

Seit den 50er Jahren wurde durch zahlreiche Studien belegt, daß das spezifische Immunsystem in der Lage ist, das Wachstum einiger Tumorarten einzuschränken. Einen Hinweis darauf lieferte die Übertragbarkeit von Tumormunität durch den adoptiven Transfer von Lymphozyten bzw. in einigen Fällen auch durch den Transfer von Antikörpern in Versuchstieren (Klein et al., 1960; Old et al., 1962; Prehn et Main 1957). Derartige Studien führten zu der Erkenntnis, daß nicht nur virale, prokaryotische und eukaryotische Pathogene, sondern auch durch Entartung unkontrolliert wachsende Tumorzellen vom Immunsystem als „fremd“ erkannt und eliminiert werden können und dadurch zu der Prägung des Begriffes der „Tumor-Immunüberwachung“ (*immune surveillance*) vor mehr als drei Jahrzehnten durch Burnet (Burnet 1967, 1970). Die Eliminierung durch die Effektorzellen des Immunsystems beruht auf den als Tumorantigen bezeichneten Strukturen, die ausschließlich oder überwiegend auf (bzw. in) entarteten Zellen vorhanden sind. Der hier verwendete Begriff „Tumorantigen“ (oder auch Tumor-assoziiertes Antigen) bezieht sich dabei auf alle derartigen Strukturen, welche mit Hilfe immunologischer Methoden nachweisbar sind (in Anlehnung an Micheel, B. 1998). Ob alle Tumore derartige Tumorantigene exprimieren, ist nicht bekannt. Durch die Entwicklung von Methoden zur systematischen Detektion von Tumorantigenen (siehe Micheel 1998, Rosenberg 2001, Smyth et al., 2001) ist jedoch inzwischen eine große Anzahl derartiger Antigene beschrieben, und Weiterentwicklungen in Zusammenhang mit dem *human genome* Projekt und der DNA-array-Technologie lassen weitere Fortschritte auf diesem Gebiet erwarten. Darunter sind Antigene, die sich qualitativ von körpereigenen Antigenen unterscheiden und deshalb als Fremd-Antigene, Neoantigene oder tumorspezifische Antigene bezeichnet werden. Hierzu gehören durch Punktmutationen, chromosomale Translokationen oder Rasterverschiebung des offenen Leserahmens in ihrer Aminosäuresequenz veränderte Proteine oder virale Antigene von Tumoviren, welche die Ursache für die Entstehung einiger Tumorarten sind (z.B. Epstein-Barr-Viren, HTLV1, Human Herpes Virus-8, Hepatitis-B/C- oder Papillomaviren). Ein weiteres Beispiel für ein tumorspezifisches Antigen bei T- oder B-Zell-Lymphomen stellen die Antigen-erkennenden Determinanten (Idiotypen) der T-Zell-Rezeptoren und Immunglobuline dar.

Die meisten der bisher beschriebenen Tumorantigene sind jedoch normale Zellbestandteile (Selbst-Antigene), die am „falschen“ Ort, zur „falschen“ Zeit oder in erhöhter Menge von Tumorzellen exprimiert werden, beispielsweise aufgrund der

Aktivierung ruhender Gene oder der Genamplifikation. Zu dieser Gruppe gehören die onkofetale Antigenen, die normalerweise in hoher Konzentration nur während der Embryonalentwicklung exprimiert werden, Muzine und verschiedene Rezeptoren (z.B. für Nährstoffe oder Wachstumsfaktoren). Weitere Mitglieder dieser Kategorie sind die Differenzierungsantigene. Differenzierungsantigene sind spezifisch für normale Zellen einer bestimmten Differenzierungsstufe und das Gewebe, aus dem der Tumor ursprünglich hervorgegangen ist. Diese Antigenen unterscheiden sich oft weder qualitativ, noch quantitativ von Selbst-Antigenen, stellen aber in der Diagnostik wertvolle „Tumormarker“ dar. Die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen derartige Differenzierungsantigene im homologen oder syngenen System (d.h. im gleichen Organismus, in dem der Tumor entstanden ist oder in einem genetisch identischen Organismus) durch eine aktive Vakzinierung ist, aufgrund der Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenen Strukturen problematisch. Eine passive Immuntherapie, z.B. unter Verwendung von im heterologen System (z.B. in der Maus) generierten monoklonalen Antikörper ist in diesem Fall aussichtsreicher.

Die Einteilung in Fremd- und Selbst-Antigenen ist bei der Entwicklung von Impfstoffen aufgrund der Toleranz gegen körpereigene Antigenen von entscheidender Bedeutung. Der zweite wesentliche Faktor bei der Wahl eines geeigneten Tumorantigenen zur Konstruktion von Vakzinen ist die Unterscheidung von so genannten einzigartigen und gemeinsamen Tumorantigenen. Die Entwicklung von individuellen Tumorstoffen zur Therapie von Tumoren, die einzigartige Tumorantigenen exprimieren – wie beispielsweise durch Punktmutationen im Genom entstandene Tumorantigenen – ist gegenwärtig nicht denkbar. Bei den meisten beschriebenen gemeinsamen Tumorantigenen handelt es sich – mit Ausnahme der Virus-induzierten Tumorantigenen – nicht um Fremd-Antigenen, sondern um körpereigene Antigenen. Die Entwicklung von aktiven Impfstoffen gegen gemeinsame, Fremd-Antigenen ist, vom immunologischen Standpunkt aus betrachtet, vergleichsweise wenig problematisch. Es ist zu erwarten, daß mit der kürzlich entwickelten Hepatitis-B Vakzine der erste wirksame Tumorstoff bereits entwickelt wurde. Leberzellkrebs (hepatozelluläres Karzinom) gehört in Südostasien zu den häufigsten Krebsarten. Der größte Teil dieser Erkrankungen wird auf Hepatitis-B (oder C) Infektionen zurückgeführt. In Taiwan wurde seit der Einführung der obligatorischen Hepatitis-B Impfung im Jahr 1984 bereits ein Rückgang der Leberkrebs-Erkrankungen in Kindern dokumentiert (Chang, M.H. et al., 1997).

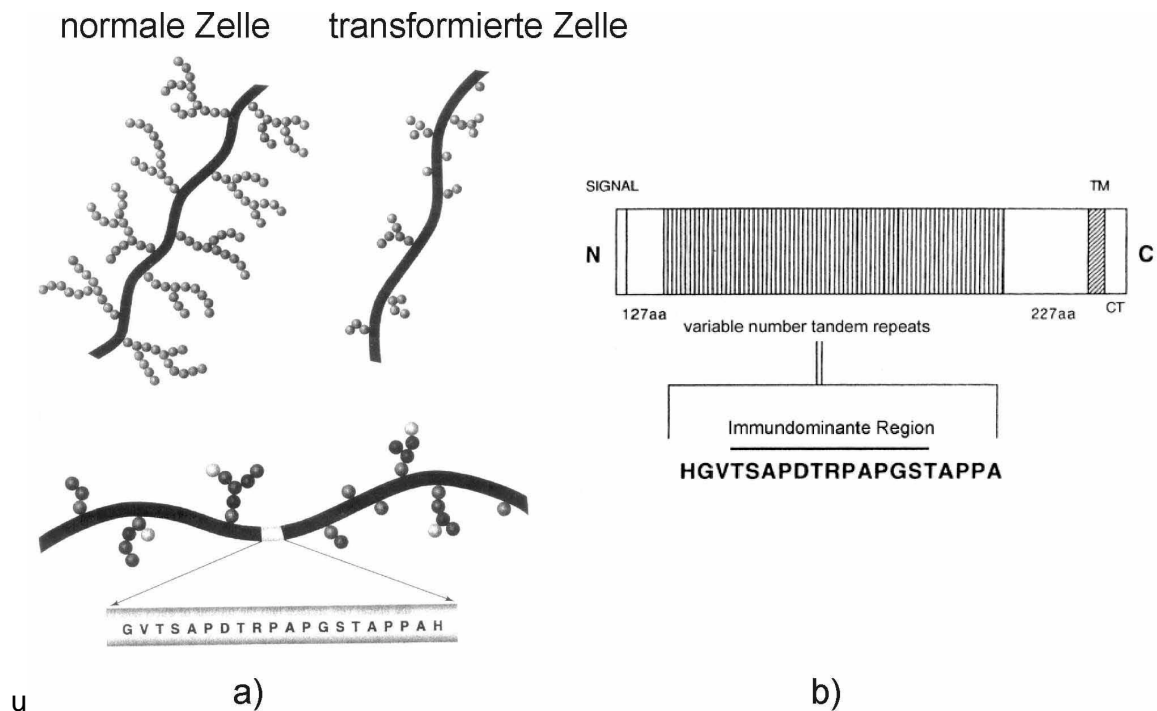


Abbildung 2-1: a: Darstellung der unterschiedlichen Glykosylierung von Muzin auf normalen und malignen Zellen (aus: Agrawal et al., 1998). b: Schematische Darstellung des Muzin Moleküls mit der intrazellulären Domäne (*cytoplasmatic tail*, CT), Transmembrandomäne (TM), *variable number tandem repeats* und Signalpeptid (aus: Graham et al., 1995). Die meisten Antikörper gegen Muzin erkennen Epitope in der dargestellten immundominanten Region innerhalb der *tandem repeat* Sequenz.

Muzine sind hochmolekulare, stark glykosylierte Proteine, die sich durch Wiederholungen gleichartiger Aminosäuresequenzen auszeichnen. **Muzin1** (kodiert durch das Gen MUC1, siehe Abb. 2-1) ist ein stark glykosyliertes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von über 200 000 Dalton, das auf der luminalen Seite sekretorischer Epithelien (z.B. Brust, Lunge, Ovarien, Pankreas) vorkommt. Der extrazelluläre Anteil des polymorphen Moleküls besteht größtenteils aus 30 bis 100 Wiederholungen der gleichen, stark O-glykosylierten Aminosäuresequenz PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA (*variable number tandem repeat sequence*, VNTR). Dieser extrem lange (mehrere hundert Nanometer!) und stark glykosylierte extrazelluläre Teil des Moleküls spielt bei der Entwicklung oder beim Schutz von sekretorischen Epithelien möglicherweise eine Rolle (Agrawal et al., 1998, Moskowitz et al., 1994). Die meisten Tumore epithelialen Ursprungs exprimieren Muzin. Auf transformierten Zellen ist die Expression stark erhöht und nicht mehr auf den apikalen Bereich beschränkt. Die Glykosylierung ist dagegen reduziert, was zur Exponierung tumorspezifischer Epitope führt (siehe Abb. 2-1) (Agrawal, B. 1998). In Mäusen generierte monoklonale Antikörper gegen Muzin-Epitope identifizieren 90% aller Brust-Karzinome und sind meistens gegen tumorspezifische Epitope innerhalb der VNTR-Sequenz gerichtet. Auf Tumorzellen ist Muzin möglicherweise durch die extrem lange und

stark glykosylierte extrazelluläre Domäne aktiv an der Metastasierung und auch dem Schutz vor tumorspezifischen Effektorzellen durch „Antigen-Maskierung“ beteiligt, indem es die Interaktion mit Adhäsionsmolekülen, NK- oder T-Zell-Rezeptoren verhindert (pers. Kommunikation Dr. J. Hilgers, Leiden / Dr. U. Karsten, MDC-Berlin). Bei an der Karzinogenese aktiv beteiligten Tumorantigenen ist die Wahrscheinlichkeit geringer, daß durch Mutation der genetisch oft instabilen Tumorzellen Mutanten entstehen, die durch Herunterregulierung des Tumorantigens der Immunabwehr entgehen (*immune escape*). Auch aufgrund seiner weiten Verbreitung auf verschiedenen Tumorarten und der Tatsache, daß es aufgrund der weniger starken Glykosylierung nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ von dem Selbst-Antigen Muzin1 unterscheidet, machen das Tumorantigen MUC1 zu einem Erfolg versprechenden Ziel für die Tumorummuntherapie.

Das onkofetale Tumorantigen **karzinoembryonales Antigen (CEA)** ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und einer der am besten charakterisierten Tumormarker. Die meisten Darm-, Magen- und Pankreas-Karzinome sowie 50% aller Brustkarzinome exprimieren CEA (Thompson et al., 1991). Das stark glykosylierte, membranständige Molekül mit einem Molekulargewicht von 180000 Dalton existiert in mehreren Isoformen und ist durch einen Phosphatidylinositolanker oder eine echte Transmembrandomäne in der Membran verankert. CEA spielt möglicherweise als homotypisches und heterotypisches interzelluläres Adhäsionsmolekül während der Embryogenese eine Rolle. Bei Erwachsenen werden lediglich geringe Mengen CEA auf Darmepithelzellen, sowie ein nahe verwandtes Molekül auf neutrophilen Leukozyten detektiert. Eine Funktion ist hier jedoch nicht bekannt (Hodge, 1996).

Das bakterielle Enzym **E. Coli beta-Galactosidase (beta-Gal)** spielt keine Rolle bei der Entwicklung von Impfstoffen gegen Pathogene, ist aber ein in der Immunologie häufig benutztes Modell-Antigen. Die Vorteile sind unter anderem die einfache Detektierbarkeit durch die enzymatische Aktivität, das Vorhandensein zahlreicher beta-Gal exprimierender (Tumor-)Zelllinien und Vektoren sowie die für verschiedene Mausstämme bekannten immundominanten T-Zell-Epitope innerhalb des Moleküls.

In C57BL/6 Mäusen stellen CEA und Muzin - ebenso wie beta-Gal – „Fremd-Antigene“ dar. Auf diesen immunologisch wesentlichen Punkt wird in den nachfolgenden Kapiteln und der Diskussion näher eingegangen.

2.2 An der Tumorummunität beteiligte Effektorsysteme

Die Induktion von spezifischer Immunität gegen Tumorzellen erfolgt durch das komplexe Zusammenspiel von antigenpräsentierenden Zellen (APC), zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), T-Helferzellen und B-Zellen sowie auch durch Effektorzellen der angeborenen Immunität (natürliche Killerzellen, NK), die entartete Zellen erkennen und abtöten können.

Zytotoxische T-Zellen (CD3+ CD8+) erkennen Antigene, die in Form von kurzen, 8 bis 10 Aminosäuren langen Peptiden auf der Zelle durch Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse I (*major histocompatibility complex class 1*, MHC-I) präsentiert werden. Aktivierte CTL, die auf ihre Zielzelle treffen, reagieren mit der Freisetzung von Perforin, Granzymen und Interferon-gamma (siehe Abb. 2-2).

Natürliche Killerzellen töten ihre Zielzelle ebenfalls durch die Ausschüttung von Perforin und Granzymen, ihre Zytotoxizität ist jedoch nicht MHC-restringiert, sondern richtet sich unspezifisch gegen alle Zellen, die keine oder wenige der körpereigenen MHC-Moleküle exprimieren. NK Zellen exprimieren Fc-Rezeptoren und sind durch die „antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität“ (ADCC) auch an der Beseitigung von Tumorzellen beteiligt, die von Antikörpern erkannt werden. Die von den **B-Zellen** produzierten Antikörper gegen membranständige Antigene induzieren auch die durch das **Komplement System** induzierte Lysis von Tumorzellen.

Professionelle antigenpräsentierende Zellen sind für die Aktivierung von naiven CTL und B-Zellen notwendig (Steinman, 1991). Während für die durch aktivierte CTL vermittelte Lysis von Tumorzellen die Präsentation von Antigenen auf wenigen MHC-I Molekülen ausreicht (siehe Abb. 2-2 oben), wird die Aktivierung und Proliferation naiver T-Lymphozyten nur durch eine hohe Dichte an MHC/Antigen-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen induziert und erfordert oft die Gegenwart von spezifischen **T-Helferzellen** (siehe Abb. 2-3) (Keene and Forman, 1982).

Dendritische Zellen sind die für die Aktivierung naiver T-Zellen hauptsächlich verantwortlichen professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Unreife dendritische Zellen sind dazu noch nicht in der Lage, sind aber sehr effektiv in der Aufnahme und in der Prozessierung von Antigenen. Diese Zellen nutzen eine Reihe verschiedener Mechanismen zur Antigen-Aufnahme (z.B. Phagozytose, Pinozytose und Fc-Rezeptorvermittelte Aufnahme, siehe Abb. 2-2 unten) und sind besonders häufig an Stellen anzutreffen, wo Pathogene in den Organismus gelangen (Haut, Darm-Mucosa).

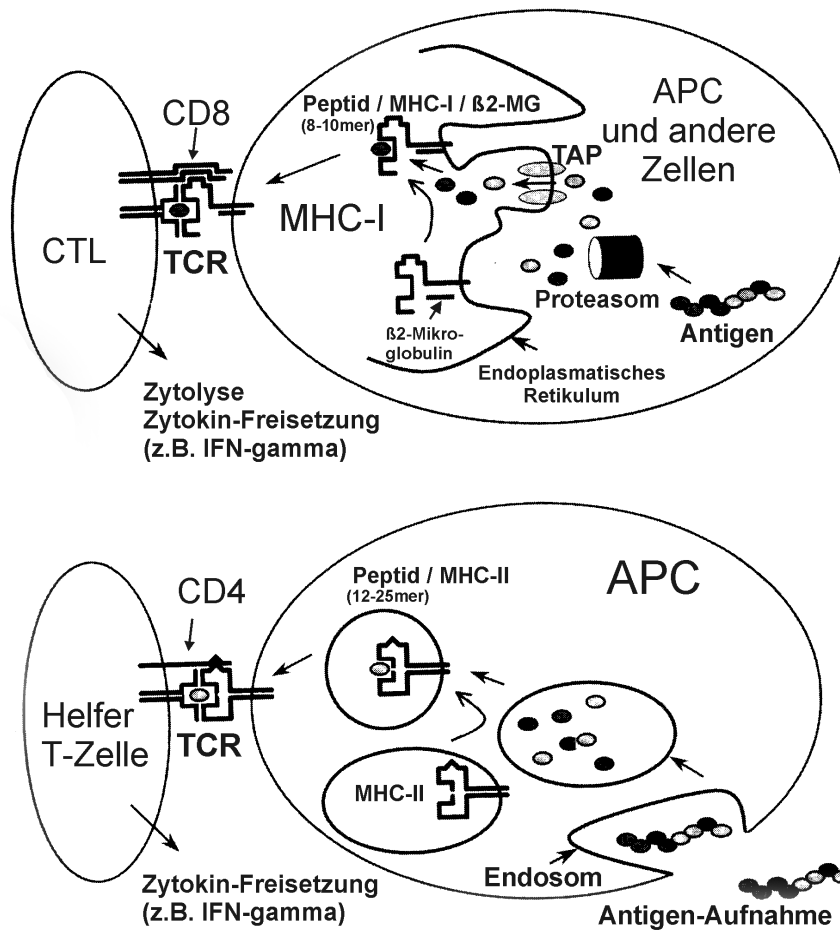


Abbildung 2-2: Darstellung der an der Antigenpräsentation und Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-I bzw. MHC-II beteiligten Komponenten. TCR: T-Zell-Rezeptor, β2-MG: beta-2-Mikroglobulin (verändert nach Lowrie et al., 2000).

Die Antigenaufnahme, Zytokine (z.B. TNF-alpha) oder bakterielle Produkte (z.B. Lipopolysaccharid, LPS) induzieren die Reifung und Wanderung der dendritischen Zellen über die afferente Lymphe in die T-Zell Zone der Lymphknoten (Steinman, 1991, Cella et al., 1997). Die Endozytose und Prozessierung von Antigenen ist in reifen dendritischen Zellen reduziert, sie sind jedoch jetzt in der Lage, die durch die sekundären lymphatischen Organe zirkulierenden naiven T-Lymphozyten zu aktivieren. Durch Phagozytose aufgenommene extrazelluläre Antigene sowie Membranproteine werden in intrazellulären Vesikeln durch Proteasen gespalten und in Form von etwa 12 bis 25 Aminosäuren langen Peptiden in MHC-Klasse II Molekülen präsentiert. Intrazelluläre Antigene werden durch den proteasomalen Abbau zytosolischer Proteine prozessiert und anschließend durch den TAP-Transporter in Form von 8 bis 12 Aminosäuren langen Peptiden in das endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie an MHC-Klasse I Moleküle binden. Die Voraussetzung, daß ein Peptid mit einer für eine T-Zell-Rezeptor-Interaktion ausreichenden

Stabilität im peptidbindenden Spalt von MHC Klasse I oder II Molekülen bindet, ist das Vorhandensein von bestimmten Aminosäuren an den 2 bis 3 „Ankerpositionen“. In der Regel werden aus jedem Protein nur einige wenige Peptide, die so genannten immundominanten T-Zell Epitope, im MHC-Komplex präsentiert (Falk et al., 1992). Abbildung 2-2 ergibt eine Übersicht über die zahlreichen Komponenten, welche bei der Aufnahme, Prozessierung und Präsentation intrazellulärer und extrazellulärer Antigene sowie bei der Interaktion von antigenpräsentierenden Zellen mit CTL und T-Helferzellen eine Rolle spielen. Alle kernhaltigen Zellen präsentieren intrazelluläre Proteine auf MHC-I Molekülen. Im Gegensatz dazu exprimieren ausschließlich „professionelle“ antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, B-Zellen, dendritische Zellen) Proteine auf MHC-II Molekülen. Nur professionelle APC sind daher in der Lage, naive T-Helferzellen, die eine Schlüsselposition bei der Kontrolle zahlreicher Effektormechanismen des Immunsystems einnehmen, zu aktivieren. In der vorliegenden Arbeit wird nur für diese Zellen der Begriff „antigenpräsentierende Zelle“ (APC) verwendet.

Dendritische Zellen (DC) sind durch einen bisher nicht im Detail aufgeklärten, in Abb. 2-2 nicht dargestellten Mechanismus in der Lage, nicht nur endogene, sondern auch aufgenommene extrazelluläre Antigene in MHC-I Molekülen zu präsentieren. Durch diesen auch *cross priming* genannten Mechanismus kann eine zytotoxische T-Zell-Antwort gegen extrazelluläre Antigene, z.B. aus absterbenden (Tumor-)Zellen induziert werden (Banchereau et Steinman, 1998, Watts, C., 1997).

Bei einer bakteriellen oder Virusinfektion beobachtet man oft die Induktion einer Helfer-unabhängigen Immunantwort, wohingegen dendritische Zellen, die Tumorantigene präsentieren, oft nur nach einer durch spezifische **T-Helferzellen** vermittelten Reifung in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren. Eine Erklärung dafür ist das Fehlen von „Gefahrensignalen“ während der Prozessierung von Tumorantigenen: Eine Präsentation von Tumorantigenen auf nicht-aktivierten dendritischen Zellen kann die Toleranz oder Anergie tumorspezifischer CTL induzieren. Ein wesentlicher Mechanismus, durch den T-Helferzellen antigenpräsentierende Zellen erkennen und diese zur Ausreifung veranlassen, wurde 1998 aufgeklärt (siehe Abb. 2-3): Die Interaktion von CD40Ligand (auf T-Helferzellen) und CD40 (auf dendritischen Zellen) „aktiviert“ die dendritischen Zellen. Diese Reifung kann ebenfalls durch die bei einigen viralen oder bakteriellen Infektionen induzierten inflammatorischen Zytokine stattfinden (Lanzavecchia, 1998; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). Nur entsprechend „aktivierte“ APC sind in der Lage, naive CD8-T-Zellen zu aktivieren.

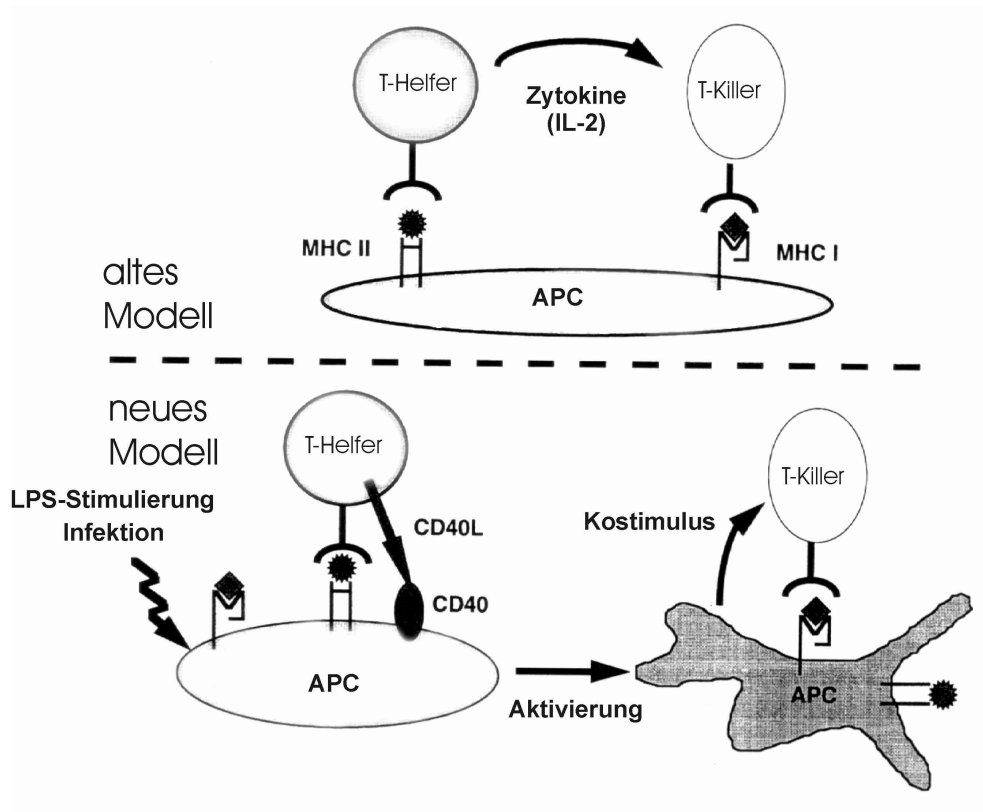


Abbildung 2-3: Der Mechanismus der T-Zell Hilfe während der Aktivierung naiver CD8-T-Zellen (in der Abb. T-Killer genannt). Nach dem alten Modell (oben) stimulieren T-Helferzellen naive CD8-T-Zellen durch die Freisetzung von Zytokinen, wenn beide ihr spezifisches Antigen gleichzeitig auf derselben APC vorfinden. Nach dem neuen Modell (unten) erfolgt zunächst die „Aktivierung“ der APC durch CD40Ligand auf T-Helferzellen oder ersatzweise durch andere Stimuli, beispielsweise eine virale Infektion oder LPS. Die aktivierte APC (grau) ist dann durch die erhöhte Expression kostimulatorischer Moleküle und Zytokine in der Lage, naive CD8-Zellen zu aktivieren (aus: Schoenberger et al., 1998).

2.3 Tumorimmuntherapie

Immunologische Ansätze zur Tumor Therapie sind seit über hundert Jahren Gegenstand intensiver Forschung. William Coley beobachtete schon 1890 die Rückbildung von Tumoren bei Tumorpatienten, die an einer bakteriellen Infektion erkrankten. Daraufhin therapierte Coley einige Krebspatienten erfolgreich mit bakteriellen Toxinen (Coley, W.B. 1896). Die Ergebnisse waren jedoch unvorhersehbar und bis heute ist der Erfolg derartiger immunmodulatorischer Maßnahmen – gemessen am betriebenen Aufwand – als gering anzusehen. Die seither erworbenen Kenntnisse über Tumorantigene, die molekularen Ursachen der Tumor Entstehung sowie die wachsende Zahl an vorhandenen Vektoren lassen jedoch hoffen, daß in Zukunft die gezielte Induktion von Tumorimmunität gelingt. Die Wirksamkeit einiger immunmodulatorischer Maßnahmen zur Tumorthherapie konnte bereits in klinischen Studien nachgewiesen werden. Dazu gehört beispielsweise die in klinischen Studien mit insgesamt mehreren hundert Patienten untersuchte Therapie von Lymphomen, Melanomen oder Nierenkrebs durch hohe Dosen des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-2 (Rosenberg et al., 1985 und 1998, Fyfe et al., 1995, Atkins et al., 1999).

Seit den ersten immuntherapeutischen Studien unter Verwendung von bestrahlten oder lysierten Tumorzellen werden derzeit eine große Zahl verschiedenster Strategien zur gezielten Induktion von Tumorimmunität untersucht, z.B. Vakzinen auf der Basis von Peptiden, rekombinanten Proteinen oder mit Peptiden beladenen Hitzeschockproteinen sowie rekombinante genetische Impfstoffe (virale oder Plasmid-Vektoren). Dendritische Zellen (beladen mit Peptiden oder Tumorzelllysate, fusioniert mit Tumorzellen, transformiert mit Tumor-RNA oder infiziert mit rekombinanten viralen Vektoren) können – ebenso wie genmodifizierte Tumorzellen, die kostimulatorische Moleküle oder Zytokine (GM-CSF, IL2, INFgamma) exprimieren, wirksame Impfstoffe darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit werden nur einige dieser Ansätze diskutiert werden, in erster Linie aktive Tumorstoffe. Eine detaillierte Übersicht findet sich beispielsweise in einem Artikel von Philippe Moingeon (Moingeon, P., 2001).

Zur immunologischen Behandlung einer bereits etablierten Infektion (z.B. Tollwut) oder zur Behandlung von Schlangenbissen werden derzeit passive Impfstoffe eingesetzt. Die Induktion einer effektiven Immunantwort durch aktive Impfstoffe kann zu langsam sein, um einen sich rasch ausbreitenden Erreger wirksam zu bekämpfen, oder Toxine zu neutralisieren. Auch die Toleranz gegenüber Tumorantigenen ist bei Studien zur

Inhibierung von Tumorwachstum durch passive Immunisierung weniger problematisch. Hier werden z.B. in Tieren generierte, eventuell mit Toxinen oder Radioisotopen gekoppelte monoklonale Antikörper oder *in vitro* expandierte tumorspezifische CTL erprobt. Vor allem zur passiven Immuntherapie von Leukämien und Lymphomen (Scheinberg et al.,1991), aber auch zur Bekämpfung von nach chirurgischer Entfernung von Kolon-Karzinomen im Körper verbleibenden Mikrometastasen (Riethmüller et al.,1994) wurden Antikörper erfolgreich eingesetzt. Mit der Ausnahme von Antikörpern, die sich gegen Rezeptoren von Wachstumsfaktoren richten, beispielsweise der gegen auf Brustkrebszellen überexprimierten HER2-Rezeptor gerichteten Antikörper Herceptin (Meden et al.,2001), haben diese im allgemeinen wenig Einfluß auf des Wachstum solider Tumore (Rosenberg 2001).

Im Gegensatz zur aktiven Immunisierung können derartige Impfstoffe auch in Patienten mit einer aufgrund einer Strahlen- oder Chemotherapie oder aufgrund des fortgeschrittenen Alters induzierten Immunschwäche angewandt werden.

Welche Gründe sprechen also für die Entwicklung von aktiven, therapeutischen Tumorimpfstoffen und auf welche Art und Weise ist die Induktion von wirksamen Tumorstoffen auf der Basis von Tumorantigenen wie Muzin, die sich nur geringfügig von körpereigenen Strukturen unterscheiden, denkbar? Aus ethischen Gründen ist die klinische Erprobung von Tumorstoffen nur an Tumorstoffen im fortgeschrittenen Stadium – also therapeutisch - möglich. Prinzipiell wäre bei Tumorimpfstoffen auch eine aktive prophylaktische Vakzinierung denkbar, falls das entsprechende Antigen – wie z.B. Muzin – ein gemeinsames Tumorantigen auf häufigen Tumoren darstellt. Passive Impfstoffe sind nicht in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen und in der Regel nur über einen Zeitraum von wenigen Wochen oder Monaten wirksam. Weiterhin besteht die Hoffnung, daß – im Gegensatz zu bakteriellen oder eukaryotischen Pathogenen – das vergleichsweise langsame Wachstum von nach einem operativen Eingriff im Körper verbleibenden Metastasen die Anwendung von aktiven, aber therapeutisch eingesetzten Impfstoffen erlaubt. Die Eliminierung von größeren, soliden Tumoren durch aktive oder passive Immuntherapie erscheint schwer vorstellbar, da diese aus verschiedenen Gründen oft für spezifische T-Zellen oder Antikörper unzugänglich sind (Riethmüller et al.,1993). In Maus-Tumormodellen konnte aber bereits gezeigt werden, daß aktive Tumorimpfstoffe, die nur geringen Einfluß auf das Wachstum etablierter, solider Tumore haben, das Wachstum von Metastasen nach einer chirurgischen Entfernung der Tumormasse sehr wirksam verhindern können (Tamura et al.,1997). Ein weiterer wichtiger Punkt ist die im Vergleich zu Antikörpern oder autologen T-Zellen weit weniger aufwendige und kostspielige Produktion von rekombinanten DNA- oder viralen Vektoren in für Vakzinierungen von Tumorstoffen ausreichender Reinheit

und Menge. Rosenberg et al. konnten 1998 zeigen, daß eine aktive therapeutische Vakzine auf der Basis von synthetischen Tumorantigen-Peptiden erfolgreich zur Therapie von etablierten Melanomen eingesetzt werden kann. Als Vakzine wurden synthetische Oligomere, die den immundominanten, HLA-A2-bindenden Epitopen des in Melanom-Zellen und in nicht-transformierten Melanozyten vorkommenden Differenzierungs-Antigens gp100 entsprechen. An den „Ankerpositionen“ wurden Aminosäuren modifiziert, um durch eine stärkere Bindung an HLA-A2 die Immunogenität zu erhöhen. 42% von insgesamt 31 vakzinierten Patienten zeigten eine objektive klinische Antwort (Rosenberg et al., 1998). Bei einigen Patienten, die aufgrund einer IL-2-Immuntherapie zur Bekämpfung von Melanomen eine Tumorregression zeigten, wurde durch die Therapie die Autoimmunerkrankung Vitiligo induziert (Rosenberg et White, 1996). Vitiligo führt zur (lokalen) Zerstörung der Pigmentzellen der Haut, ist aber keine lebensbedrohende Erkrankung. Die Ergebnisse dieser Studien weisen darauf hin, daß auch im Menschen durch aktive Immunisierung eine Therapie etablierter Tumore möglich ist und auch die Induktion gegen Selbst-Antigene, wie die Melanozyten-Differenzierungsantigene, möglich ist.

In Tiermodellen werden derzeit Vakzinen zur Immuntherapie von Muzin-exprimierenden Tumoren auf der Basis von Retroviren (Henderson et al., 1998), replikationskompetenten Vakzinia Viren (Acres et al., 1993), Epstein-Barr-Virus-transformierten-B-Zellen (Pecher and Finn, 1996), Adenoviren (Kaplan et al., 1999, Gong et al., 1997), sowie synthetischen MUC1 Peptiden untersucht (Apostolopoulos et al., 1998). Es gibt Hinweise darauf, daß Muzin nicht nur in Form von an MHC-I gebundenen Oligopeptiden von CTL erkannt werden kann, sondern auch eine HLA-unrestringierte T-Zell-Antwort induziert werden kann. Dieses Phänomen wird durch die repetitive Struktur der VNTR Sequenz erklärt, welche durch eine Quervernetzung vieler T-Zell-Rezeptoren einen T-Zell-aktivierenden Stimulus darstellt, der normalerweise nur durch eine Präsentation im MHC-Kontext und entsprechende Kostimuli induziert wird (Pecher and Finn, 1996).

Besonders effektiven Schutz vor Tumorwachstum bieten dendritische Zellen, die durch Fusion mit Tumorzellen, virale Infektion oder Inkubation mit synthetischen Peptiden Muzin-Epitope präsentieren (Gong et al., 1997). Erste klinische Studien weisen darauf hin, daß mit synthetischen Peptiden beladene oder mit Tumorzellen fusionierte dendritische Zellen geeignet sind, auch im Menschen eine humorale und zelluläre Antwort gegen Muzin-Epitope zu induzieren (Kugler et al., 2000, Brossart et al., 2000). Kugler et al. konnten eine signifikante klinische Antwort in Tumorpatienten dokumentieren, die mit Fusionszellen aus autologen Tumorzellen und allogenen dendritischen Zellen vakziniert wurden. Die verwendete Fusionsmethode erwies sich jedoch als nicht reproduzierbar und die Relevanz der dargestellten Daten bleibt zweifelhaft (Birmingham 2001). Statistisch

abgesicherte Daten über die Rückbildung oder Stabilisierung von Muzin-positiven Tumoren liegen bis heute nicht vor. Auch der für die Einschätzung der Wirksamkeit in klinischen Studien zur Tumorummuntherapie geforderte Nachweis der Induktion einer zellulären Immunantwort gelang bisher nur in Einzelfällen.

2.4 Die Vektoren pCI und MVA

Die intramuskuläre Injektion von Plasmid-Vektoren („nackte“ DNA-Vakzinierung) wurde bisher nur in einer Studie mit mäßigem Erfolg zur Immuntherapie von Muzin-exprimierenden Tumoren im Maus Modell getestet (Graham et al., 1996). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Vektor pCI wurde bereits zur Induktion von Immunität gegen virale Pathogene erfolgreich eingesetzt (Bahloul et al., 1998, Hu et al., 1999, Kwissa et al., 2000, Wild et al., 1999). Die intramuskuläre oder intradermale Injektion von DNA induziert sowohl eine humorale als auch zelluläre Antwort. Die Expression von Reportergenen sowie Antigen-spezifische Antikörper konnten in Mäusen auch ein Jahr nach der Injektion noch nachgewiesen werden (Donnelly et al., 1997, Pardoll et Beckerleg, 1995, Wolff et al., 1992). Im Gegensatz zu viralen Vektoren stellt die Induktion einer Immunantwort gegen eventuell immundominante virale Epitope sowie eine mögliche Replikation (z.B. durch Rekombination replikationsdefizienter Viren) oder die Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern durch den Kontakt mit verwandten humanpathogenen Viren kein Problem dar. Inzwischen wurde in mehreren klinischen Studien gezeigt, daß DNA Impfstoffe auch im Menschen sicher angewandt werden können. Der verwendete pCI Vektor besitzt Eigenschaften, die eine stabile, hohe Expression des eingefügten Gens (*insert* oder Transgen) in Säugerzellen gewährleisten: Auf der 5'- Seite ist dem Transgen ein kurzes Intron vorgelagert. Die Insertion des Introns vor dem *insert* soll die Verwendung kryptischer *splice*-Stellen (im *insert*) unterbinden. Eine graphische Darstellung der pCI und MVA-Vektoren ist in Kap. 5.1 dargestellt.

Eine Kombination von DNA-Vektoren mit rekombinantem MVA ist denkbar. Das attenuierte Vaccinia Virus wurde mehr als 500mal auf embryonalen Hühnerfibroblasten (CEF) passagiert und hat während der *in vitro* Kultur mehrere große Bereiche seines Genoms deletiert (insgesamt 31Kb von ca. 200 Kb). Pockenviren haben während ihrer Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt, um der Immunantwort des Wirts zu entgehen. Verschiedene Vaccinia Stämme besitzen beispielsweise Gene von löslichen Rezeptoren für Zytokine, CC-Chemokine, TNF und Interferone. Die Sekretion dieser

Proteine von Virus-infizierten Zellen kann die Induktion von Immunität erschweren. Unter den bei MVA deletierten Genen befinden sich Gene mehrerer dieser immunmodulatorischen Proteine. Das Virus infiziert nach wie vor unterschiedliche Zelltypen verschiedener Arten, es kommt aber nicht zur Entstehung von vollständigen infektiösen Partikeln. Dieser nicht-replikationskompetente Stamm wurde bereits als Pockenimpfstoff bei über 150 000 Individuen angewandt und kann daher als einer der sichersten viralen Vektoren für klinische Studien angesehen werden. Für Laborarbeiten mit MVA ist lediglich der S1-Sicherheitsstandard vorgesehen. Im Gegensatz zur Pockenvakzinierung mit replikationskompetenten Vakzinia Viren wurden bei Verwendung von MVA auch in immunsupprimierten Personen keine Nebeneffekte beobachtet (Fenner, 1989, Mayr et al., 1978). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit ist bereits in einigen Studien der erfolgreiche Einsatz von Impfstoffen auf der Basis von rekombinanten MVA-Viren zur Therapie viraler oder eukaryotischer Infektionserkrankungen demonstriert worden. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit ist bereits in einigen Studien der erfolgreiche Einsatz von Impfstoffen auf der Basis rekombinanter MVA-Viren zur Therapie verschiedener viraler sowie eukaryotischer Infektionserkrankungen demonstriert worden. In einer von Carroll et al. durchgeführten Studie konnten MVA-Viren auch erfolgreich zur Therapie von beta-Galaktosidase-exprimierenden Tumorzellen eingesetzt werden (Carroll et al., 1997, Hanke and McMichael, 1999, Schneider et al., 1998, Sutter et al., 1994). Es gibt Hinweise darauf, daß die Wirksamkeit von MVA in der Immuntherapie vergleichbar ist mit der Effizienz replikationskompetenter Vakzinia Stämme (Ramirez et al., 2000). Diese und neuere Studien zum Einsatz von MVA-Viren in der Impfstoffentwicklung werden in der Diskussion ausführlicher diskutiert.

Die Entwicklung von aktiven Impfstoffen gehört zu den größten Errungenschaften der modernen Medizin und es besteht Grund zu der Hoffnung, daß in Zukunft auch bestimmte Tumorerkrankungen durch derartige Impfstoffe bekämpft werden können. Erste Erfolge auf diesem Gebiet deuten sich – wie bereits erwähnt – bei virusinduzierten Tumoren, Melanomen, Leukämien und Lymphomen an. Die Tumormimmuntherapie auf der Basis von genetischen Impfstoffen befindet sich aber noch in der experimentellen Phase. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob und auf welche Art und Weise die Induktion einer starken CTL-Antwort und schützender Tumormimmunität durch Vakzinen auf der Basis von DNA und MVA gelingt. Da sowohl beta-Gal als auch Muzin und CEA in C57BL/6 Mäusen Fremd-Antigene sind, sind die beobachteten Ergebnisse nicht direkt auf die Situation im Menschen übertragbar, sondern entsprechen eher der Therapie von Tumoren, die Neoantigene exprimieren, beispielsweise virale Tumorantigene oder durch Verschiebung des offenen Leserasters generierte Tumorantigene. Die durchgeführten Experimente stellen aber eine Grundlage für weitere, in der Diskussion näher erläuterte

Experimente dar, in denen dieser Aspekt berücksichtigt werden soll. Verschiedene Autoren betonen, daß gegenwärtig das Hauptproblem bei der Auswertung von klinischen Studien das Fehlen eines immunologischen „Markers“ ist, der mit der *in vivo* Wirksamkeit der Vakzine korreliert (Gruijl et al., 1999, Topalian 2001). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit, neben der Analyse der *in vivo*-Wirksamkeit der verschiedenen Vakzinen, ein Schwerpunkt auf die Quantifizierung Tumorantigen-spezifischer CTL gelegt.

3 Material

3.1 Bakterien

Aus der Stammsammlung der Arbeitsgruppe wurden verwendet:

E. coli XL1 Blue (Bullock et al., 1987) *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ($r_k^- m_k^+$), *supE* 44, *relA1*, *lac^-*[F', *proAB*, *lacI^qZΔM15*, Tn10 (tet^r)]

E. coli DH5Δ (Vieira und Messing, 1982) F⁻, Δ80d, *lacZΔM15*, *endA1*, *recA1*, *hsdR17* ($r_k^- m_k^+$), *supE44*, *thi-1*, *d⁻*, *gyrA96*, Δ (*lacZYA-argF*), U169

3.2 Vektoren

Die Plasmide pCl (Promega GmbH, Mannheim), pBK-CMV (Stratagene GmbH, Heidelberg), Rc/CMV und pcDNA3.1/His B/LacZ (Invitrogen BV, Leek, Holland) wurden der Stammsammlung der Arbeitsgruppe entnommen. Das MVA-Virus sowie der Transfervektor puc2LZp75#14 wurden freundlicherweise von Dr. G. Sutter (GSF, München) zur Verfügung gestellt. Die cDNA für CEA wurde aus dem Vektor AdCEA/IL12 (Hagen Kulbe, MDC-Berlin) umkloniert. Dieser Vektor enthält die cDNA von CEA aus einem von Pelegrin et al. konstruierten Plasmid (Pelegrin et al., 1992). Der Vektor pCl-MUC1 wurde durch umklonieren der Mucin cDNA aus dem Vektor RcCMV-MUC1 (Thomas Schirman, MDC-Berlin) generiert. Das Plamid RcCMV-MUC1 enthält das MUC1-Gen aus einem ursprünglich von O.J. Finn zur Verfügung gestellten Vektor (Henderson et al., 1998).

3.3 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden der Stammsammlung der Arbeitsgruppe entnommen:

BHK - embryonale Hamster-Nieren-Zelllinie ECACC 85011433

HEK293 humane, embryonale Nieren-Zelllinie ATCC CRL-1573

MC38, MC38-MUC1 und MC38-CEA wurden von Dr. J. Schlom, NIH, Maryland zur Verfügung gestellt (Lorenz et al., 1999)

MCA205-beta-Gal wurde von Dr. S. Cayeux, MDC-Berlin, Deutschland, zur Verfügung gestellt (Cayeux et al., 1999, Aicher et al., 1997)

J558-CD40Ligand wurde von Peter Lane, Oxford, zur Verfügung gestellt (Lane et al., 1995)

3.4 Mäuse

C57BL/6 Mäuse wurden von der Charles River Deutschland GmbH (Sulzfeld) bezogen.

3.5 Oligonucleotide

Der Sequenzierprimer HJV5' (5'IRD-800-markiert) 5'-TAT TCT AAT TTA TTG CAC GG-3' wurde von MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland, synthetisiert.

3.6 Enzyme

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg:

Restriktionsenzyme, Thermo Sequenase cycle sequencing kit

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Alkalische Phosphatase; Klenow-Polymerase; RNaseA; T4-DNA-Ligase; Restriktionsenzyme

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot:

Restriktionsenzyme

New England Biolabs, Schwalbach:

Alkalische Phosphatase; Klenow-Polymerase; T4 DNA-Ligase; T4 DNA-Polymerase; Restriktionsenzyme;

Stratagene, San Diego, Calif., USA:

Restriktionsenzyme

3.7 Antikörper und Konjugate

Zur Detektion der Tumorantigene Muzin und CEA wurden die Antikörper BC-2 (anti-Muzin1, Medac, Hamburg) und der von P. Jantscheff generierte anti-CEA Antikörper D14-HD11 (Jantscheff et al., 1991) eingesetzt. Beide Antikörper sind murine monoklonale IgG1-Antikörper.

Jackson Immuno Research Laboratories, West Groove, PA, USA:

Ratte-anti-Maus-IgG (FITC-markiert), Ratte-anti-Maus-IgG (PE-markiert)

Pharmingen, Hamburg, Germany:

PE oder FITC-Konjugate von Ratte-anti-Maus-CD8 / CD80 / CD86 / 1A^b (MHC-II) / NLDC-145, FITC oder PE-konjugierte IgG-Isotypenkontrollen, CyChrome-markiertes Streptavidin

Immunotech: PE oder FITC-Konjugate von Maus-anti-human-CD 80 / 83 / 86 / MHC-I / MHC-II und Isotypenkontrollen

Caltag Laboratories, Burlingame CA 94010, USA:

FITC-Konjugat von Ratte-anti-Maus-IFN γ

Southern Biotechnologies, Birmingham, Alabama, USA:

Hamster-anti-Maus-CD40Ligand (Klon 3/23)

3.8 Chemikalien, Geräte und sonstige Materialien

Sofern nicht im Text angegeben, wurden folgende Chemikalien und Geräte verwendet:

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg: 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); PVDF-Membranen

Bachofer, Reutlingen: UV-Schirm

Beckman Instruments GmbH, Klosterneuburg: Zentrifugen: Optima TLX, GS-6KR, J2-MI

Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg: Durchflußzytometer FACScan; FACSCalibur, FACSTlow

Biochrom KG, Berlin: DMEM; Ficoll-Separating-Solution; FCS; PBSd; Trypsin

Biometra GmbH, Göttingen: Trio-Thermoblock

BioRad GmbH, München: Gene-Pulser; Power Supply 200/2.0, Proteinmarker, Mini-Gelsystem, Mini-Blotsystem

Biosynthan, Berlin: synthetische Peptide (Muzin60mer, Muzin105mer, beta-Gal und

Muzin 8-10mere)

Biozym: Pipettenspitzen

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim: Adenosin-5'-triphosphat (ATP); Agarose; Albumin Fraktion V (BSA); Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)

Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main: Dithiothreitol (DTT);

Costar GmbH, Bodenheim: 96-Loch-Mikrotiterplatten

Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA: Bacto-Agar; Bacto Trypton; Hefe-Extrakt

Dynatech: Elisa-Reader MR 5000

Dupont: [⁵¹Cr]Natriumchromat

Eppendorf Gerätebau, Hamburg: Tischzentrifuge 5415; Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,2 ml, Elektroporationsküvetten

Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm:

Chloroform; Formamid

Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein:

DMEM-Medium; FKS; G418; Glutamin; 2-Mercaptoethanol (für Zellkultur); Penizillin-Streptomycin; RPMI-Medium, Low-melting-point-Agarose (für Zellkultur), Lipofectin, Lipofectamin

Gilson Medical Electronics: Pipetman 2µl, 20µl, 200l, 1000µl

Greiner GmbH, Nürtingen:

FACS-Röhrchen; Zellkulturflaschen; Plastik-Reagenzröhrchen 10 ml

Hereaus Instruments GmbH, Hanau:

Brutschränke; Zentrifugen: Biofuge 13, 15 und 28RS; Minifuge RF; Varifuge 3, 2RS und 20RS

Hybaid, Teddington, Großbritannien:

Gelelektrophoresekammern

IEC, Needham Hights, MA, USA:

MicroMax Tischzentrifuge

Membrapure, Bodenheim:

Sterilfiltrations-Systeme

E. Merck AG, Darmstadt:

Ammoniumperoxodisulfat; Ampicillin; Borsäure; Bromphenolblau; Chloroform; Dikaliumhydrogenphosphat; Dimethylformamid (DMF); Dimethylsulfoxid (DMSO); Dinatriumhydrogenphosphat; Essigsäure; Ethanol; Ethidiumbromid; Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Formaldehyd; Formamid; Glucose; HEPES; Isoamylalkohol; Isopropanol; Kaliumacetat; Kaliumchlorid; Kaliumdihydrogenphosphat; Kaliumhydroxid; Kalziumchlorid; Magnesiumchlorid; Natriumacetat; Natriumchlorid; Natriumcitrat; Natriumdihydrogenphosphat; Natriumdodecylsulfat (SDS); Natriumhydrogencarbonat; Paraffinöl; Phenol; Salzsäure; Saccharose; Tetramethylethylen-diamin (TEMED); Triton X-100;

MWG-Biotech: Gelelektrophoresekammern, Li-Cor DNA-Sequencer Model 4200L

New England Biolabs, Schwalbach: 1kB-DNA-Leiter

Nunc-GmbH, Wiesbaden:

Kryoröhrchen 2 ml; Impfnadeln und Impfösen; 96-Loch-Mikrotiterplatten; Plastikpetrischalen; Zellkulturflaschen; Zellkulturschalen

Packard Instruments, Meriden, CT, USA

TopCount Mikrotiterplattenzähler; LumaPlates; TopSeal Folie

Qiagen GmbH, Düsseldorf:

Qiagen Plasmid Kits

R&D-Systems:

Maus-GM-CSF, humanes IL4, humanes GM-CSF

Recker, Berlin:

50 ml Röhrchen; Zellkultur-Schalen und -Flaschen

Roth, Karlsruhe:

Agar-Agar; Aceton; Dithiothreitol (DTT); Ethanol; Glycerin; Hefe-Extrakt; HEPES; Isopropanol; Kaliumacetat; Kaliumcarbonat; Methanol; Paraformaldehyd; Pepton aus Casein (Trypton); Phenol;

Sartorius GmbH, Göttingen:

Minisart NML Sterilfilter 0,2 und 0,45 µm Porengröße

Serva, Heidelberg:

Acrylamid; Glaswatte; Harnstoff; N,N'-Methylbisacrylamid; Silikonlösung;

Shimadzu Europe GmbH, Duisburg:

Fluoreszenzspektrophotometer RS 1502

Sigma Chemie, München:

Ampicillin; Ethidiumbromid; 2-Mercaptoethanol; L-Histidinol

Whatman Limited, Springfield Mill, Maidstone, Ky., USA:

3 MM-Papier

4 Methoden

4.1 Bakterienkulturen

4.1.1 Flüssigkulturen

Antibiotikum	Stammlösung	Lösungsmittel	Endkonzentration	LB-Medium
Ampicillin	50 mg/ml	50 % Ethanol	100 µg/ml	10 g/l Trypton
Kanamycin	10 mg/ml	H ₂ O	30 µg/ml	5 g/l Hefeextrakt
				5 g/l NaCl

Steriles LB-Medium (gegebenenfalls mit Antibiotika) wurde aus einer Glycerinkultur oder durch eine einzelne Kolonie auf einer Agar-Platte angeimpft und über Nacht in einem Schüttler bei 260 Upm und 37°C inkubiert.

4.1.2 Plattenkulturen

LB-Medium wurde nach Zugabe von 15g/l Agar-Agar autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 55°C wurden die erforderlichen Antibiotika in den oben genannten Endkonzentrationen zugegeben und das warme Medium in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren und kurzen Trocknen können die Platten für mehrere Wochen gelagert werden. Nach dem Ausstreichen von Glycerin- oder Flüssigkulturen oder Ligationsansätzen entstanden auf den Platten nach 8 bis 18h Kolonien, die nach dem Verschluss der Platte mit Parafilm mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden konnten.

4.1.3 Lagerung

Die langfristige Lagerung von Bakterien erfolgte durch Mischen einer Übernachtskultur mit einem gleichen Volumen 80%igem sterilem Glycerin in Kryo-Röhrchen bei -80°C.

4.2 Klonierungen

4.2.1 Herstellung von chemokompetenten Bakterien

Zur Herstellung von kompetenten Bakterien wurde 0,5ml einer Übernachtskultur mit 50ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 37°C geschüttelt (ca. 2h). Die Bakterien wurden auf Eis gekühlt, pelletiert (4°C, 10min, 1200g), in eiskaltem 0,05M $CaCl_2$ resuspendiert, 30min auf Eis gelagert, erneut zentrifugiert und in 2ml kaltem 0,05M $CaCl_2$ resuspendiert. Die Zellen wurden 2h auf Eis gelagert und nach Zugabe von 0,2ml Glycerin aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.2 Herstellung von elektrokompetenten Bakterien

50ml LB-Medium wurde mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht kultiviert. 20ml der Vorkultur wurden in 1l LB-Medium bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,6 weiter inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien bei 2000g zentrifugiert (4°C, 15min), zweimal in sterilem Wasser gewaschen (500ml) und ein drittes Mal in 40ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei 4000g (4°C, 15min) wurden die Zellen in 2ml 10% Glycerin aufgenommen, in 100µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.3 Transformation chemokompetenter Bakterien

Maximal 10µl einer Plasmid-DNA Lösung oder Ligation wurden zu 100µl auf Eis aufgetauten chemokompetenten Bakterien gegeben und 30 bis 60min auf Eis inkubiert. Nach einem „Hitzeschock“ (1min im Wasserbad bei 37°C) wurden die Bakterien wieder auf Eis abgekühlt und anschließend mit 1ml LB-Medium ohne Antibiotika 1h bei 37°C geschüttelt. Je nach erwarteter Transformationseffizienz wurde ein Teil oder (nach Pelletieren und Resuspension in 200µl LB) der gesamte Transformationsansatz auf Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37°C 8 bis 16h inkubiert.

4.2.4 Transformation elektrokompeter Bakterien

Maximal 2µl eines Ligationsansatzes wurden mit 100µl elektrokompeteren Bakterien vermischt und auf Eis eine Minute inkubiert. In einer gekühlten Küvette (2mm Elektrodenabstand) wurden die Zellen elektroporiert (2,5KV, 200 Ohm, 25µF) und, wie für transformierte chemokompeterente Zellen beschrieben, angeschüttelt und ausplattiert. Die Transformation durch Elektroporation war mindestens zehnfach ergiebiger als das oben beschriebene Verfahren mit chemokompeteren Zellen und wurde bei Klonierungen angewandt, bei denen sehr viele Klone analysiert werden mußten.

4.3 Isolierung von DNA aus Bakterien

4.3.1 Alkalischer Schnellaufschluß

RNase-Lösung	Puffer P1	Puffer P2	Puffer 3
10mM Tris-HCl (pH 7,5) 15mM NaCl 10mg/ml RNaseA	50mM Tris-HCl (pH 8,0) 10mM EDTA 100µg/ml RNaseA	0,2M NaOH 1 % SDS	3M Kaliumacetat

Ca. 1,5 bis 3ml einer Übernachtskultur wurden für 1min bei 13200 Upm in der Tischzentrifuge pelletiert und in 0,2ml P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 0,2ml P2, vorsichtiges Mischen und Inkubation bei RT (5min) erfolgte die Lysis und der Verdau bakterieller RNA. Nach der Zugabe von 0,2ml P3 wurde der sich bildende Niederschlag aus SDS, Bakterienzellwand und genomischer DNA abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde durch Ethanol-Fällung die Plasmid DNA gewonnen.

4.3.2 Alkalischer Schnellaufschluß auf 96-Loch Mikrotiterplatten

Mit diesem Verfahren konnten bis zu 192 Plasmidpräparationen an einem Tag präpariert und analysiert werden, da die meisten Schritte mit Multikanal-Pipetten durchgeführt werden können. Dazu wurden Bakterienkolonien mit Pipettenspitzen in mit 600µl LB gefüllte 1,3ml FACS-Röhrchen übertragen und in einem FACS-Röhrchenständer über Nacht geschüttelt. Die Pipettenspitzen können – falls dem LB-Medium Antibiotika zugesetzt wurden - in den Röhrchen verbleiben und zur Entnahme der Kultur am nächsten Tag verwendet werden. Von der Kultur wurden 200µl auf eine Mikrotiterplatte

übertragen. Nach der Zentrifugation (5 min bei 3750rpm) wurden erneut 200µl in die gleichen Vertiefungen pipettiert und die Zentrifugation wiederholt. Die Pellets wurden in 40µl P1 resuspendiert und durch Zugabe von 40µl P2 5 Minuten lysiert. Nach der Zugabe von 40µl P3 werden aus jeder Vertiefung 80µl in eine Mikrotiterplatte übertragen und mit 200µl absolutem Ethanol gefällt. Nach dem Trocken wurde die DNA in 30µl Wasser aufgenommen und davon 10µl für analytische Restriktionsspaltungen eingesetzt.

4.3.3 Plasmidisolierung über alkalischen Aufschluß und Anionenaustauscher-Chromatographie

Puffer P4	Puffer P5	Puffer P6
0,6M NaCl	0,8M NaCl	1,25M NaCl
0,15% Triton-X-100	0,1M NaAcetat, pH 5	0,1M NaAcetat, pH 8, 5
0,1M NaAcetat, pH 5		

Für Vakzinierungen verwendete DNA wurde durch Anionenaustauscher-Säulenchromatographie nach Angaben des Herstellers (JetStar Maxi Prep) gereinigt. Im Gegensatz zum alkalischen Schnellaufschluss wurde die DNA nicht direkt nach Zugabe von P3 gefällt, sondern auf eine mit Puffer 4 äquilibrierte Säule gegeben. Die DNA bindet unter diesen Bedingungen an die Matrix auf Silicagel-Basis und wurde mit Puffer P5 gewaschen und mit P6 eluiert. Nach Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol wurde die DNA bei 13 000g präzipitiert, mit absolutem Ethanol gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 0,5ml Wasser aufgenommen.

4.4 Präparation und Analyse von DNA

4.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA über Agarosegele

10 x TBE	6 x Auftragspuffer
0.9 M Tris-HCl, pH 8,0	40 % Saccharose
0.9 M Borsäure	0,2 % Bromphenolblau
50 mM EDTA	

DNA Fragmente in 1xProbenpuffer wurden in Abhängigkeit von ihrer Größe durch Agarose-Horizontalgele (0,8 bis 1,5% Agarose in 1xTBE mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid) bei einer von der Gelgröße abhängigen Spannung von 80 bis 200V (ca. 6V/cm Elektrodenabstand) aufgetrennt. Die Position der DNA wird durch die Fluoreszenz der durch Ethidiumbromid gefärbten DNA auf dem UV-Tisch (366nm) sichtbar. Eine aufwendigere, aber extrem hochauflösende Verfahren zur Bestimmung der Größe von einzelsträngigen DNA-Fragmenten ist die im Kapitel „Sequenzierung von DNA“ beschriebene Elektrophorese von DNA auf Polyacrylamid-Harnstoffgelen.

4.4.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen für Klonierungen erfolgte durch Verwendung des Qiaex-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers oder durch Zentrifugation des Gelblocks durch Glaswolle. Dazu wurden 0,5ml Eppendorf Gefäße mit einer Kanüle am Boden durchlöchert, die Öffnung mit Glaswolle abgedichtet, und das 0,5ml Gefäß in ein 1,5ml Eppendorf Gefäß gesellt. Nach der Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (5min) wurde aus der sich im unteren Gefäß sammelnden Lösung die DNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung gewonnen.

4.4.3 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion

Zur Abtrennung von Protein-Kontaminationen wurden wäßrige DNA-Lösungen in einem Mindestvolumen von 0,1ml mit einem gleichen Volumen mit Tris HCl-pH 8 (0,1M) abgesättigtem Phenol versetzt und 1min kräftig geschüttelt (Vortex). Nach der Zentrifugation (1min bei 13000 upm) wurde die wässrige Phase mit der DNA mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohl (24:1) versetzt und erneut kräftig gemischt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde die wäßrige Phase abgenommen und die DNA durch Ethanolfällung präzipitiert.

4.4.4 Präzipitation von Nukleinsäuren mit Alkohol

Zur Reinigung und Aufkonzentrierung von wässrigen DNA-Lösungen wurde eine Ethanol-Präzipitation durchgeführt. Die DNA wurde mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 4,8 vermischt. Nach der Zugabe des 2,5-fachen Volumens absolutem Ethanol erfolgte die Präzipitation bei -20°C für mindestens 1h oder -80°C für 30min. Die DNA wurde in der Tischzentrifuge bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit pelletiert (30min) und das Pellet in kaltem absolutem Ethanol gewaschen und erneut kurz zentrifugiert (5min, 4°C). Nach der Abnahme des Ethanols und Trocknen des Pellets wurde die DNA in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

4.4.5 Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260nm bezogen auf eine H₂O-Referenzprobe. Bei einer Schichtdicke von 1cm in der Küvette entspricht eine Absorption von 1 50µg doppelsträngiger DNA bzw. 40µg RNA oder 20µg Oligonucleotid. In Abwesenheit von RNA kann durch die Bestimmung des Quotienten A_{260} / A_{280} (Absorptionsmaximum von Proteinen) die Reinheit der DNA bestimmt werden. Dieser Quotient hat bei reiner DNA einen Wert von 1,8, bei RNA einen Wert von 2,0. Die Bestimmung der Konzentration sehr geringer DNA-Mengen, vor allen Dingen gelgereinigte DNA-Fragmente für Ligationen, erfolgte durch Gelelektrophorese auf Ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen. Die Intensität der Bande wurde mit der Intensität der Banden von Fragmenten ähnlicher Größe eines DNA-Fragments bekannter Konzentration ermittelt. Die Detektionsgrenze durch Ethidiumbromidfärbung liegt bei ca. 5ng DNA.

4.5 Enzymatische Reaktionen an DNA

4.5.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem bei der empfohlenen Temperatur durchgeführt. Eine Einheit der Restriktionsendonuclease schneidet unter optimalen Bedingungen und bei Vorliegen hochreiner DNA 1µg DNA in einer Stunde. Bei unreinen DNA Präparationen wurde die Enzymmenge auf maximal 1/10 des Gesamtvolumens erhöht.

4.5.2 Abspaltung von 5'-Phosphatresten mit alkalischer Phosphatase

Vor allen Dingen bei Ligationen von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden war die Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors unbedingt erforderlich, um eine Rezirkularisierung zu vermeiden. Dazu wurden zu dem Restriktionsansatz etwa 1U alkalische Phosphatase pro 10µg DNA gegeben und bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Nach einer (partiellen) Hitzeinaktivierung (10min, 70°C) wurde die DNA durch Phenolextraktion und Ethanolfällung gereinigt.

4.5.3 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden mit Klenow-Polymerase

5x Klenow-Polymerase Puffer
100mM Tris-HCl pH 7,5
50mM MgCl₂
75mM DTT
350mM KCl

Durch das Auffüllen von 5'-überhängenden Enden mit Klenow-Polymerase wurden stumpfe Enden für Ligationen generiert. Dazu wurde in 20µl 1x Klenow Puffer 1 bis 2 U Klenow Polymerase pro 5µg DNA mit Desoxynukleotiden (50-100µM pro Nukleotid) bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt bei 75°C für 10min. Klenow-Polymerase besitzt auch eine 3'→5'Exonucleaseaktivität und kann zur Generierung von stumpfen Enden aus 3'-Überhängen verwendet werden. Für diesen Zweck war der Einsatz von T4-DNA-Polymerase jedoch erfolgreicher.

4.5.4 Abspaltung von 3'-überhängenden Enden mit T4-DNA-Polymerase

10 x T4-DNA-Polymerase-Puffer

500mM NaCl
100mM Tris-HCl pH 7,9
100mM MgCl₂
10mM DTT
1,7mg/ml BSA

Die Abspaltung von 3'-überhängenden Enden erfolgte mit T4-DNA-Polymerase. Dazu wurden 5µg DNA in einem Volumen von 20 µl 1x T4-DNA-Polymerase-Puffer mit ca. 5 U T4-DNA-Polymerase gemischt und bei 37°C für 20min inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung bei 75°C (10min) und Reinigung der DNA durch Phenolextraktion und Ethanolfällung.

4.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten

10 x T4-DNA-Ligase Puffer

700mM Tris-HCl
100mM MgCl₂
10mM DTT
10mM ATP

20 bis 50ng linearisierter, dephosphorylierter Vektor wurden in einem Volumen von 20µl 1x Ligase Puffer mit 1 U Ligase und einem 2 bis 10-fachen (molaren) Überschuß des zu klonierenden DNA-Fragments (*insert*) bei 16°C für 1h bei RT inkubiert. Bei den nur sehr ineffizient verlaufenden Klonierungen größerer DNA-Fragmente (>2Kb) mit stumpfen Enden wurde die Menge an T4-Ligase auf maximal 1/10 des Volumens des Ligationsansatzes erhöht und bei 14°C über Nacht ligiert. Diese Ligationen erforderten eine sorgfältige Dephosphorylierung.

4.6 Sequenzierung von DNA

4.6.1 Sequenzierung von DNA mit dem LICOR System

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem *Thermo Sequenase cycle sequencing Kit* (Amersham). Das Verfahren entspricht einer PCR-Reaktion mit lediglich einem einzigen, 5'-fluoreszenzmarkierten Primer. Der zufällige Einbau von 2',3'-Didesoxynucleotiden führt dabei zum Kettenabbruch. Für die Sequenzierungsreaktion wurden 2 bis 3µg DNA mit 2pmol des markierten Primers in 19,6 µl Wasser gelöst und 1,4µl DMSO zugegeben. 4,5µl dieser Mischung wurden in 0,5ml-PCR-Reaktionsgefäße gegeben, die jeweils 1,5µl der mitgelieferten Reagenzien A, C, G oder T enthielten. In diesen Reagenzien sind die Sequenase-DNA-Polymerase, Desoxynukleotide sowie jeweils eines der Didesoxynukleotide ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP enthalten. Nach dem Überschichten mit einem Tropfen Mineralöl erfolgte die Reaktion in einem Thermocycler mit dem folgenden Programm:

1. Denaturierung 2min 90°C
2. 30 Zyklen:

Denaturierung:	15s	90°C
Annealing	15s	50°C
Polymerisation	60s	72°C

Nach der Reaktion wurde zu jeder Probe 5µl Stop Puffer zugegeben und 1µl jeder Reaktion auf einem vertikalen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

4.6.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese

44cm Sequenziergel:	Probenpuffer	Laufpuffer
7M Harnstoff	95% Formamid	1xTBE
1x TBE	10mM EDTA	
6% Polyacrylamid	0,1% Fuchsin	
	0,01%Bromphenolblau	

Die Auftrennung der durch den Kettenabbruch in der Sequenzreaktion entstandenen Fragmente von ca. 30 bis 1000 Nukleotiden erfolgte durch denaturierende Polyacrylamid-Harnstoffgele von 0,25mm Dicke und 44cm Länge. Die Glasplatten wurden zuvor mit 10% SDS, Wasser und 70% Ethanol gereinigt. Die Polymerisation der durch Sterilfiltration gereinigten Gellösung wurde durch die Zugabe von 40µl TEMED und 400µl 10% Ammoniumpersulfat induziert. Die Proben (maximal 1µl) wurden nach einem Vorlauf von 30 Minuten aufgetragen und bei 1500V über Nacht aufgetrennt. Die Detektion der Banden erfolgt kontinuierlich während der Elektrophorese durch eine Anregung der Fluorochrom-markierten DNA-Fragmente mit Hilfe eines Lasers und Detektion der Fluoreszenz durch eine entsprechende Optik.

4.7 Kultivierung eukaryotischer Zellen

4.7.1 Zellkulturmedien und Zellvermehrung

Kulturmedium für Suspensionszellen	Kulturmedium für adhärenente Zellen	PBS	Trypsin-Lösung
RPMI-1640	DMEM	8g NaCl	0,25% Trypsin
10% FCS	10% FCS	0,2g KCl	0,05% EDTA
100U/ml Penizillin	100U/ml Penizillin	1,44g Na ₂ HPO ₄	in PBS
100µg/ml Streptomycin	100µg/ml Streptomycin	ad 1l H ₂ O	
	50µm 2-Mercaptoethanol		

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5%CO₂ im Brutschrank kultiviert. FCS wurde grundsätzlich durch Erhitzen auf 56°C (45min) inaktiviert. Einige Zellen brauchen besondere Wachstumsfaktoren (z.B. IL2 oder GM-CSF) oder Selektionsmarker zur Aufrechterhaltung der Expression stabil integrierter Gene (z.B. L-Histidinol oder G418). Alle Abweichungen in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt.

Zur Vermehrung wurden adhärenente Zellen kurz vor Erreichen der vollständigen Konfluenz mit PBS gewaschen und durch Trypsinisierung abgelöst (ca. 1min). Suspensionszellen und durch Trypsinisierung vollständig resuspendierte adhärenente Zellen wurden im Verhältnis 1:4 bis 1:10 in frischen Zellkulturschalen ausgesät.

4.7.2 Lagerung

Zur Lagerung wurden Suspensionszellen oder trypsinisierte adhärenente Zellen in PBS gewaschen und in einer Konzentration von möglichst mindestens 10^7 Zellen / ml in FCS / 10% DMSO in einer speziellen Einfrierbox langsam eingefroren und in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Zur Reaktivierung wurden eingefrorene Zellen schnell aufgetaut, in PBS gewaschen und vor der Aussaat sorgfältig resuspendiert.

4.7.3 Bestimmung des Anteils lebensfähiger Zellen

Zur Zellzählung und Bestimmung des Anteils lebensfähiger Zellen wurden die Zellen durch Trypanblau-Lösung angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Der Farbstoff färbt lediglich tote Zellen aufgrund ihrer defekten Membranstruktur. Alternativ kann der Anteil der toten Zellen durch die im Kapitel „Durchflußzytometrische Analyse“ beschriebene Propidiumiodid-Färbung ermittelt werden.

4.8 Proteinexpression in eukaryotischen Zellen

4.8.1 Transfektion durch die Kalziumphosphat-Methode

2 x HEBS

280mM NaCl
1 mM KCl
1,1 mM Na_2HPO_4
10 mM Dextrose
40 mM HEPES
pH 7,08

Die Transfektion mit der Kalziumphosphat-Methode lieferte vor allem bei 293-Zellen sehr hohe Transfektionsraten (>50%). Hierzu wurden am Vortag in 10cm-Zellkulturschalen ausgesäte, semikonfluente Zellen verwendet. 40µg DNA wurden mit 50µl 2,5M CaCl_2 gemischt und mit Wasser auf ein Volumen von 0,5ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde tropfenweise unter ständigem Durchmischen (Vortex) in ein gleiches Volumen HEBS-Puffer gegeben. Nach ca. 15 Minuten Inkubation bei RT wurde das sich bildende Präzipitat aus DNA-haltigen Salzkristallen auf die Zellen gegeben. Nach 6 bis 14h (über Nacht) wurde das Medium ausgetauscht. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 20 bis 24 Stunden durch Trypsinisierung.

4.8.2 Liposomale Transfektion

Die Liposomale Transfektion wurde zur Transfektion von BHK-Zellen eingesetzt und ist im Kapitel „Klonierung rekombinanter MVA-Viren“ beschrieben. Für jede Zelllinie wurde die optimale DNA-Menge und die optimale Liposomen Präparation (Lipofectin, Lipofectamin) experimentell bestimmt.

4.9 Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Trenngelpuffer	Polyacrylamid-Lösung	4xProbenpuffer
0,1%SDS 1,5M Tris/HCl pH 8,8	30% Acrylamid 0,8% Bis-Acrylamid	10% Glycerin 20% SDS 10% β -Mercaptoethanol 0,01% Bromphenolblau 80mM Tris HCl pH 6,8
Sammelgelpuffer	5xElektrophorese- puffer	
0,1%SDS 1M Tris/HCl pH 6,8	15,1g Tris 72g Glycin 5g SDS ad 1l H ₂ O	

Die Auftrennung von Proteinen vor der *Western blot* Analyse erfolgte in Glycingelen nach der Lämmli-Methode. Um schärfere Banden zu erhalten, wurden die Trenngele nach dem Auspolymerisieren mit einem Sammelgel überschichtet. Die in der folgenden Tabelle angegebenen Mengen sind ausreichen für eine Elektrophorese mit Biorad-Minigelkammern. Die trypsinisierten und pelletierten Zellen von einer 10cm-Schale oder einer T-75-Zellkulturflasche wurden in 300 μ l 2xProbenpuffer aufgekocht (5min, 95°C) und 2-20 μ l Aliquots bei 150V elektrophoretisch aufgetrennt.

Lösung	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
Trenngelpuffer	1,5ml	
Sammelgelpuffer		0,9ml
Polyacrylamid-Lösung	2ml	0,6ml
destilliertes Wasser	2,5ml	2,04ml
10% APS	50 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	1 μ l

4.10 Nachweis von Proteinen durch *Western blot* Analyse

Transferpuffer	TBS	Phosphatase-Puffer
25mM Tris 192mM Glycin	10mM Tris pH 8,0 150mM NaCl	100mM Tris pH 7,5 100mM NaCl 5mM MgCl ₂
Blockierlösung	TBST	NBT/BCIP-Substrat
5% FCS oder Magermilchpulver in TBST	10mM Tris pH 8,0 150mM NaCl 0,05% Tween-20	66µl NBT (50mg/ml in 70%DMSO) 33µl BCIP (50mg/ml in DMFA) ad 10ml Phosphatase-Puffer

4.10.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membranen erfolgte in Biorad-Miniblot Apparaturen im Naßverfahren. Dazu wurde ein Stapel aus mit einem mit Transfer Puffer angefeuchtetem Schwamm, zwei Whatman-Papieren, dem Proteingel, der PDVF-Membran, zwei feuchte Whatman-Papiere und ein weiterer feuchter Schwamm in die Blotvorrichtung eingespannt. Die PDVF-Membran wurde zuvor 30 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend in Transfer-Puffer gewaschen. Luftblasen zwischen der Membran und dem Gel müssen unbedingt vermieden werden. Der Transfer erfolgte bei 70V in einer Stunde.

4.10.2 Immundetektion durch AP-konjugierte Antikörper

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran 1h bei RT in Blockierlösung geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen (5min) wurde eine geeignete Verdünnung der Primärantikörper (BC2: 1:50, D14-HD11: 1:400) in TBST 1h gefärbt. Nach drei Waschschritten (2x5min, 1x15min) wurde der alkalische Phosphatase konjugierte Sekundärantikörper anti-Maus-IgG in einer Verdünnung von 1:4000 in TBST zugegeben. Nach drei weiteren Waschschrritten erfolgte die Farbreaktion durch die Zugabe von 10m NBT/BCIP-Lösung. Die Reaktion wurde durch Waschen in Wasser gestoppt.

4.10.3 Immundetektion mit dem ECL-System

Der Chemolumineszenznachweis wurde mit Hilfe des ECL (*enhanced chemoluminescence*) Kit (Amersham) entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt worden. Mit der in Cellophanfolie luftblasenfrei eingewickelten Membran wurden bei einer von der Intensität der Bande abhängigen Belichtungszeit (1 - 10min) Röntgenfilme belichtet.

4.11 Präparation primärer eukaryotischer Zellen

4.11.1 Präparation von embryonalen Hühnerfibroblasten (CEF)

Zur Generierung von CEF-Zellen für die Kultur von MVA-Viren wurden 9-10 Tage alte Hühnerembryonen (Firma Lohmann, Deutschland) aus 20 Eiern steril entnommen und durch Abtrennen des Kopfes sofort getötet. Die Embryonen wurden durch Pressen durch eine 10ml Spritze homogenisiert und in einem Erlmeyerkolben mit 200ml 37°C warmer Trypsin-Lösung (siehe oben) 5 Minuten gerührt. Nach der Sedimentation von Gewebeteilen wurde der Überstand steril durch Mullbinden oder Gaze in einen Kolben mit 400ml PBS / 10% FCS (auf Eis) dekantiert. Das sedimentierte Gewebe wurde erneut für 10 Minuten mit frischer Trypsinlösung bei 37°C trypsinisiert und der Vorgang wiederholt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (350g, 10min), in FCS resuspendiert und auf eine Konzentration von ca. 200×10^6 Zellen / ml mit FCS eingestellt. Nach Zugabe von 10% DMSO wurden 1ml Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Bedarf verwendet. Dazu wurden die aufgetauten Zellen durch auf- und ab pipettieren resuspendiert und in einer T75 Zellkulturflasche ausgesäht (DMEM-high glucose / 10% FCS / Antibiotika). Am folgenden Morgen wurden die nicht-adhärennten Zellen komplett entfernt. Die erste Teilung erfolgte im Verhältnis 1:2, die darauffolgenden im Verhältnis von maximal 1:8. Nach der 8. Passage verlangsamt sich das Zellwachstum. CEF-Zellen der Passage 2 bis 8 wurden erfolgreich für die Amplifikation und Titration der MVA Viren eingesetzt.

4.11.2 Isolierung von humanen peripheren Blutlymphozyten (PBL)

50ml Blut gesunder Spender wurde mit 100 U Heparin (0,2ml Liquemin 25000) gemischt und mit PBS-d auf das doppelte Volumen mit RPMI verdünnt. Erythrozyten und polymorphkernige Zellen wurden von den mononukleären Zellen durch eine Dichtegradientenzentrifugation über ein Lymphoprep-Kissen (1,077 g/ml) getrennt. Dafür wurden in 50ml Polypropylenröhrchen 12 ml Lymphoprep bei 20°C vorgelegt und vorsichtig mit dem heparinisierten Vollblut überschichtet und für 30 Minuten mit 600 g bei Raumtemperatur und abgeschalteter Bremse zentrifugiert. Der gelbliche Ring von mononukleären Zellen und Thrombozyten an der Interphase wurde abgesaugt pelletiert (10min, 600g) und in 7ml PBS resuspendiert. Zur Abtrennung der Thrombozyten wurde eine zweite Zentrifugation auf einem Optiprep™ (1,063g/ml) Kissen durchgeführt. Die resuspendierten Zellen wurden in 15ml Polypropylenröhrchn auf 7ml Optiprep aufgeschichtet und 15min bei 350g und 20°C zentrifugiert. Die Thrombozyten bilden einen gelblichen Ring an der Phasengrenze. Das Zellpellet besteht überwiegend aus Lymphozyten und Monozyten.

4.11.3 Präparation von murinen Milzzellen

10 x Lysis-Puffer

89,9g NH₄Cl

10,0g KHCO₃

370mg EDTA

ad 1l H₂O, pH 7,3

Mausmilzen wurden mit dem Stempel einer 10ml Spritze auf Kunststoff-Gaze in einer Petrischale zerrieben und in PBS gewaschen und pelletiert (350g, 10min). Zur Depletion der Erythrozyten wurde das Pellet in einem 15ml Röhrchen in Lysis Puffer resuspendiert (5min bei RT), mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (350g, 10min) und ein weiteres Mal gewaschen. Die Anzahl an gewonnenen Milzzellen lag (bei nicht vergrößerten Milzen) bei 40 bis 70 Millionen Zellen.

4.12 Amplifikation und Klonierung rekombinanter MVA-Viren

4.12.1 Amplifikation von Wildtyp und rekombinanten MVA

Um Probleme aufgrund der genetischen Instabilität von Vakzinia Viren zu vermeiden, wurden vor Beginn der *in vivo* Experimente ausreichende Mengen von Wildtyp und rekombinanten MVA Viren amplifiziert. Da in CEF-Zellen mehr infektiöse Partikel entstehen als in BHK Zellen (ca. 200 pro Zelle) wurden konfluente CEF-Zellen aus optimal proliferierenden Passagen (2 bis 8) als Wirtszellen verwendet. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von primären Zellen ist ihre genetische Stabilität sowie die Möglichkeit der kurzfristigen Lagerung (bis zu 14 Tage) nicht benötigter Zellen bei 30°C und 5%CO₂. Die gelagerten Zellen können nach einer erneuten Teilung verwendet werden. Die erste Passage erfolgte in einer T75-Zellkulturschale in 10ml Medium. Die Ernte der infizierten Zellen erfolgte, wenn 100% aller Zellen einen zytopathischen Effekt zeigen (Abrunden), in der Regel nach 2 bis 3 Tagen Kultur bei 37°C. Durch 3-maliges Einfrieren und Auftauen wurden die Zellen lysiert. Da auch in lysierten Zellen der größte Teil der Viren Zell-assoziiert bleibt, wurden die geernteten Zellen sonifiziert. Von diesem unaufgereinigten Viruslysat werden 2ml für die Generierung der 2. Passage in einer T175-Zellkulturschale verwendet, der Rest wurde für die Charakterisierung des Virus verwendet und als „1. Passage“ (für eine eventuell notwendige erneute Amplifikation) eingefroren. Die Infektion von CEF-Zellen mit unaufgereinigtem Virus-Lysat erfolgt in einem kleinen Volumen (5 bzw. 10 ml für T75 oder T175 Zellkulturflaschen). Nach einer 2-Stündigen Inkubation bei 37°C wird das Medium durch frisches Medium ersetzt. Das Zell-Lysat der 2. Passage wurde komplett zur Infektion von 12 konfluenten T175-Zellkulturschalen eingesetzt. Nach der Infektion erfolgte die Kultur in einem Volumen von 16ml.

4.12.2 Sonifikation

Der verwendete *cup-sonicator* ermöglicht die intensive und sterile Vereinzelung von Virus-Aggregaten in Eppendorf oder Falcon-Röhrchen. Die Sonifikation mit Ultraschall wurde zur Trennung von Virus Partikeln von zellulären Bestandteilen während der Amplifikation, sowie zur Vereinzelung von Virus-Aggregaten, die durch das Einfrieren entstehen. Bei Experimenten, die eine definierte MOI erfordern, wurde eine definierte Beschallung von 4 x 1min unter Eiskühlung bei 50% Intervall (also insgesamt 2 Minuten Beschallung) durchgeführt. Das Eis wurde zwischendurch aufgefüllt. Die Sonifikation erhöhte den Titer

eingefrorener, aufgereinigter Viruspräparationen um den Faktor 1,5 bis 3. Bei der Sonifikation von pelletierten infizierten Zellen wurde die Beschallung wiederholt, bis eine vollständige Resuspension erfolgt war.

4.12.3 Aufreinigung der MVA Viren

Für alle *in vivo* Experimente wurden auf einem Sukrose-Kissen aufgereinigte MVA-Präparationen verwendet. Dazu wurde die 3. Passage wie oben beschrieben geerntet, die zellulären Bestandteile pelletiert (10min, 500g) und der Überstand vereinigt. Das Pellet wurde nach Resuspension in 2ml PBS-D in einem 15ml Falcon-Röhrchen sonifiziert, mit 10ml des gesammelten Überstandes vereinigt und die zellulären Bestandteile erneut durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand dieser Zentrifugation mit den durch die Sonifikation freigesetzten Viren wurde mit dem zuvor gesammelten Überstand vereinigt und durch Zentrifugation auf einem Sukrose Kissen aufkonzentriert. Dazu wurde der Überstand (ca. 180ml) vorsichtig auf 6 mit 7ml sterilfiltrierter 36%ige Sukroselösung gefüllten, sterilen SW28-Zentrifugationsröhrchen aufgeschichtet und 80min bei 33 000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2,5ml 10mM Tris-Cl pH9 resuspendiert. Mit dieser Methode betrug die Ausbeute an aufgereinigten Viren sehr konstant 7 bis 9×10^9 PFU (aus 12 T175 Zellkulturflaschen).

4.12.4 Bestimmung des Virustiters

Die Bestimmung des Virustiters durch *Limiting Dilution* (TCID₅₀) verlief nicht erfolgreich, da die zur Verfügung stehenden BHK oder CEF-Zellen die für diese Methode notwendige mehrtägige Kultur in 96-Loch-Mikrotiterplatten nicht überstanden. Daher wurde der Virustiter durch Auszählen von Plaques auf einem in Medium mit 1% Agarose kultivierten, infizierten konfluenten CEF-Zellrasen in 6-Loch Zellkulturschalen bestimmt. Die Infektion erfolgte mit sonifizierten, aufgereinigten Viren in 0,5ml DMEM in 2h bei 37°C und 5% CO₂. Durch die Adhäsion des Mediums an der Wand der Zellkulturschale werden bevorzugt CEF-Zellen am Rand der Zellkulturschale infiziert. Dieser Effekt konnte durch ein regelmäßiges Schwenken verhindert werden. Auch ein 15-minütiges langsames Schwenken auf einem Schüttler (bei Raumtemperatur und ohne CO₂) führte zu einer gleichmäßigen Infektion des Zellrasens ohne die Lebensfähigkeit der Wirtszellen zu beeinträchtigen. Nach zwei bis drei Tagen entstanden aus einzelnen infizierten Zellen 1 bis 2mm große Löcher im Zellrasen. Durch Anfärbung des Zellrasens mit Neutralrot (Wildtyp-MVA) bzw. Beta-Galactosidase (rekombinante MVA) lassen sich die Plaques makroskopisch erkennen. Nach der Infektion wird das Medium komplett durch 2,5ml CEF-

Kulturmedium mit 1% *low melting point* (LMP) Agarose ersetzt. Dazu wurden bei -20°C gelagerte Aliquots einer 4% LMP-Agarose-Lösung im Wasserbad geschmolzen und mit einem gleichen Volumen auf 37°C erwärmten 2xDMEM vermischt. Nach der Abkühlung auf 42°C wurde die 2%ige Lösung mit einem gleichen Volumen CEF-Kulturmedium (37°C), auf den infizierten Zellrasen pipettiert und bei RT (30min) oder 4°C (10min) gehärtet. Nach 48 bis 56h wurden die entstandenen Plaques durch Überschichten mit 1ml 1%-Agarose-Medium mit X-Gal (400ng/ml) bzw. Neutralrot (100ng/ml) sichtbar gemacht.

Die folgende Verdünnungsreihe lieferte für alle hergestellten Viruspräparationen eine für die Bestimmung des Virustiters geeignete Anzahl von Plaques (mindestens 20) in einer Vertiefung nach der Formel:

$$\text{Virustiter} = \text{Zahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} / \text{Volumen}$$

Verdünnungs-	10 ⁶	5x10 ⁶	25x10 ⁶	125x10 ⁶	625x10 ⁶	3125x10 ⁶
faktor:						
Volumen:	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml

4.12.5 Klonierung rekombinanter MVA Viren

4.12.5.1 *Transiente Expression*

Die bereits durch analytischen Restriktionsspaltung und Sequenzierung auf die korrekte Insertion von Muzin, GFP und CEA überprüften puc2LZp75#14 Vektoren wurden vor der Generierung rekombinanter Viren auf die Expression der Proteine in transient transfizierten Zellen überprüft. Da die klonierten Gene unter der Kontrolle des Vakzinia P7.5 Promotors exprimiert werden, müssen die Zellen zunächst mit MVA infiziert werden (MOI 10, 60min, 37°C). Aufgrund der hohen Transfektionsrate (50%) und der Infizierbarkeit wurden BHK Zellen verwendet. Die Transfektionrate erfolgte in (semikonfluenten) 6-Loch Zellkulturschalen nach der oben beschriebenen Methode mit 2,5µg Plasmid und 10µl Lipofektamin in 1ml OptiMEM. Nach 6 bis 14h wurde 1ml DMEM/20% FCS zugegeben. Die Zellen wurden nach 20h geerntet und auf die Expression von GFP, Muzin und CEA überprüft. Da auch in nicht-infizierten Zellen eine

geringe Expression detektierbar war, wurden als negative Kontrollen sowohl mock-DNA transfizierte, als auch transfizierte, aber nicht infizierte BHK-Zellen analysiert.

4.12.5.2 Generierung rekombinanter MVA durch homologe Rekombination

Die Generierung von rekombinanten Viren erfolgte in infizierten Zellen durch homologe Rekombination. Die in Abb. 5-1 dargestellten Sequenzen FLANK1 und FLANK2 Sequenzen, welche die Deletion II im MVA Genom flankieren. Zusammen mit dem unter Kontrolle des P7.5 exprimierten insertierten Gen wird das Reporter-gen Beta-Galactosidase unter Kontrolle des P11 Promotors in das MVA-Genom stabil integriert. Die Infektion und Transfektion erfolgte wie bei der transienten Expression beschrieben, allerdings mit der sehr viel niedrigeren MOI von 0,05. Nicht absorbiertes Virus wurde durch zweimaliges Waschen mit OptiMEM entfernt und der Zellrasen nach 48 mit einem Zell-Schaber geerntet. Die Zellen einer Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturschale wurden in einem Volumen von 1ml DMEM wie oben beschreiben 3-mal eingefroren und aufgetaut und beschallt. Wie unter „Bestimmung des Virustiters“ beschrieben, erfolgte mit dieser Viruspräparation jetzt die Infektion einer konfluenten 6-Loch Zellkulturschale CEF-Zellen nach folgendem Schema:

Verdünnungs- faktor:	UNVERDÜNNT	5	25	125	625	3125
Volumen:	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml

Nach 2h wurden die Zellen mit 3ml CEF-Medium/1% Agarose wie oben beschrieben überschichtet und nach 56h durch Überschichten mit X-Gal-Agarose gefärbt. Durch den Überschuß an Wildtyp-Virus sind die Plaques in diesem Stadium oft nur unter dem Mikroskop zu erkennen. Wenn mehrere, nebeneinanderliegende Zellen gefärbt sind, handelt es sich um rekombinanten Virus. Mindestens 5 Plaques werden mit einer blauen Pipettenspitze ausgestochen und in 0,5ml Medium resuspendiert. Mit einem der Plaques wurde das beschriebene Verfahren (einfrieren, beschallen, Infektion) wiederholt, die restlichen wurden eingefroren. Nach ca. 6-8 Runden der Plaque-Aufreinigung waren in der Regel keine nicht durch X-gal färbbaren Wildtyp-Plaques detektierbar und die oben beschriebene Amplifikation wurde durchgeführt.

4.13 *In vitro* Generierung, Reifung und Infektion von dendritischen Zellen

4.13.1 Generierung humaner dendritischer Zellen aus Monozyten

Zur Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten wurden die mit der oben beschriebenen Methode aufgereinigten peripheren Blutlymphozyten in PBS gewaschen (4°C, 300g, 10min) und in IMDM / 10% AB-Serum / 50µg/ml Gentamycin in 6-Loch Zellkulturschalen kultiviert (5-10⁶ Zellen / Vertiefung). Das Mg²⁺ und Ca²⁺-reiche Medium fördert die Adhärenz der Monozyten an die Kulturschale. Nach 2h wurden die nicht-adhären Zellen abgenommen und die Monozyten vorsichtig mit warmen RPMI gewaschen. In Gegenwart von 500U/ml IL-4 (Costar) und 800 U/ml GM-CSF (Essex Pharma) entwickeln sich aus den adhären Monozyten innerhalb von 5 bis 7 Tagen dendritische Zellen, die zunehmend weniger adhären sind, stark aggregieren, und die für dendritische Zellen typische Morphologie (zahlreiche lappige oder längliche Fortsätze) sowie distinkte Oberflächenmarker aufweisen. Um die Zytokinkonzentrationen aufrecht zu erhalten, wurde jeden zweiten Tag 1ml Medium abgenommen und durch 1,5ml frisches Medium (37°C) ersetzt.

4.13.2 Generierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark

Zur Gewinnung von Knochenmark wurden Oberschenkelknochen von weiblichen C57BL/6 Mäusen präpariert, 1min in 70% Ethanol sterilisiert, in PBS gewaschen und in PBS (auf Eis) maximal 2h gelagert. Nach dem Entfernen der Gelenkkapseln wurden die Markstränge mit 5ml PBS / 5% FCS unter Verwendung einer 10ml Spritze und 0,8mm Kanüle ausgespült. Das Knochenmark wurde mit Hilfe der verwendeten Spritze vorsichtig resuspendiert, in PBS gewaschen und bei einer Zelldichte von 5x10⁶ Zellen/ml in RPMI / 10% FCS / 50µM Mercaptoethanol unter Zusatz von 50% konditioniertem Medium kultiviert. Die Ausbeute betrug je nach Alter und Größe der Mäuse ca. 7x10⁶ Zellen pro Knochen. Bei dem konditionierten Medium handelte es sich um Zellkulturüberstand einer genmodifizierten NIH-3T3-Zelllinie, die murines GM-CSF sezerniert (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. T. Blankenstein, MDC-Berlin). Unter diesen Bedingungen entwickeln sich Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Die Vorläuferzellen der

dendritischen Zellen wachsen zunächst adhären und dann in den oben beschriebenen proliferierenden Zellaggregaten. Zur Anreicherung wurden nach ca 14h (über Nacht) die nicht-adhären Zellen durch Waschen mit warmen PBS geerntet. Die verbleibenden Zellen sind in erster Linie stark adhären Stroma Zellen und enthalten nur wenige DC-Vorläuferzellen. Die Ernte und Kultur (bei 5×10^6 Zellen/ml) der nicht-adhären Zellen in neuen Zellkulturflaschen wurde am zweiten und dritten Tag wiederholt. Am Tag 4 noch nicht adhären Zellen wurden verworfen und die am Tag zwei und drei adhären Zellen zu dendritischen Zellen ausdifferenziert. Ab Tag 4 wachsen die DC-Vorläuferzellen zunehmend in Suspension und lösen Zellaggregationen. Das Medium wurde täglich vollständig durch Zentrifugation der Zellen (350g, 10min, 4°C) und Resuspension in GM-CSF enthaltendem Medium bei einer Zelldichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml ersetzt. Am Tag 7 bis 9 wurden die jetzt nicht-adhären Zellen oder schwach adhären DC durch Waschen mit warmem PBS geerntet. Zur terminalen Reifung und Entfernung von adhären wachsenden Makrophagen wurden die Zellen in neuen Zellkulturflaschen kultiviert und nach 24h durchflußzytometrisch untersucht.

4.13.3 Terminale Reifung dendritischer Zellen

Die terminale Reifung humaner oder muriner dendritischer Zellen erfolgte durch Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS, 0,5µg/ml) oder bestrahlten J558-CD40L Zellen (10^6 pro 5×10^6 DC) 24h vor der Ernte. Die Expression von CD40Ligand auf den Stimulatorzellen J558-CD40L wurde zuvor durchflußzytometrisch überprüft und die Zellen bestrahlt (50 Gray) und 2x gewaschen, um Restmengen des Selektionsmarkers L-Histidinol zu entfernen. Für *in vivo* Experimente wurden die Stimulatorzellen vor der Injektion der DC durch Depletion über *MACS depletion columns* (Milteny Biotec) nach den Angaben des Herstellers entfernt. Dazu wurden die Zellen mit Biotin konjugiertem anti-Maus-CD40L Antikörper (Southern Biotechnologies, (1µl / 10^6 J558-CD40L-Zellen) gefärbt, gewaschen und an MACS-Streptavidin-*microbeads* (1µl / 10^6 J558-CD40L-Zellen) gebunden.

4.13.4 Infektion der dendritischen Zellen

Die Infektion von dendritischen Zellen erfolgte in einem kleinen Volumen (0,5ml) in 15ml Röhren oder 6-Loch Zellkulturschalen bei gelegentlichem Schütteln über einen Zeitraum von 2h. Nicht absorbiertes Virus wurde durch einmaliges Waschen mit PBS entfernt. Die optimale *multiplicity of infection* (MOI) wurde experimentell ermittelt.

4.14 Durchflußzytometrie

4.14.1 Nachweis von Oberflächenmarkern

FACS-Puffer	Dissoziationspuffer	Trypsin-Lösung
0,1% NaN ₃ 2% FCS in PBS	2mM EDTA 10mM Glukose (ohne Ca ²⁺ -, Mg ²⁺ -Salze) in PBS	0,25% Trypsin 0,05% EDTA in PBS

Bei der durchflußzytometrischen (FACS) Analyse werden in einem Flüssigkeitsstrahl hydrodynamisch fokussierte Einzelzellen durch einen Laserstrahl angeregt und für jede einzelne Zelle Fluoreszenz und Lichtstreuung gemessen. Die Intensität des vor- bzw. seitwärts gestreuten Lichts (*forward* bzw. *side scatter*) ermöglicht dabei eine Aussage über die Größe bzw. Granularität der Zelle. Die Messung der Fluoreszenz einer mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbten Zelle ermöglicht eine quantitative Aussage über die Expression bestimmter Moleküle. Zur Analyse von Oberflächenmarkern adhärent wachsender Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und - falls möglich - mit nicht-Trypsinhaltigem Dissoziationspuffer abgelöst. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde in 96-Loch Rundboden-Mikrotiterplatten durchgeführt. Um geringe quantitative Unterschiede nachzuweisen sowie bei der Färbung von Zellen, die Fc-Rezeptoren exprimieren, wurden die Zellen zunächst in FACS-Puffer mit 5% Serum der Spezies, in welcher der Fluorochrom-markierte Antikörper generiert wurde, in einem Volumen von 25µl blockiert (30min auf Eis). Die Färbung erfolgte durch Zugabe einer zuvor für jede Färbung optimierten Menge an Fluorochrom-markiertem Antigen-spezifischen Antikörper in 25µl FACS Puffer. Nach 30min auf Eis wurde mit FACS-Puffer aufgefüllt und der Überstand nach Zentrifugation (300g, 5min) entfernt und ein zweites Mal gewaschen. Falls der Antigen-spezifische Antikörper unmarkiert oder biotinyliert vorlag (primärer Antikörper), erfolgte die Färbung durch eine zweite Inkubation mit Fluorochrom-markiertem Sekundärantikörper bzw. Streptavidin-Fluorochrom-Konjugat (in 50µl FACS Puffer, 30min auf Eis). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen durchflußzytometrisch untersucht. Die Färbung von intrazellulären Epitopen erfolgte wie im Abschnitt „Intrazelluläre Interferon-gamma Färbung“ beschrieben.

4.14.2 Propidiumiodid-Färbung toter Zellen

Zum Nachweis toter Zellen wurden diese mit Propidiumiodid (1µg/ml) angefärbt. Nur die Membran toter Zellen ist für diesen Farbstoff permeabel. Propidiumiodid interkaliert

intrazellulär mit DNA was eine starke im Kanal 3 des „FACScan“ meßbare Fluoreszenz induziert.

4.15 Tierexperimente

C57BL/6 Mäuse (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland) wurden unter standardisierten pathogenfreien Bedingungen bei 20°C, 50% Luftfeuchtigkeit und einem 12h hell/dunkel Rhythmus gehalten. Alle Experimente wurden entsprechend den deutschen Tierschutzrichtlinien durchgeführt. Die Immunisierungen erfolgten intramuskulär in den Oberschenkel (DNA, MVA) oder intravenös (MVA und dendritische Zellen). Die Vitalität der injizierten Tumorzellen wurde vor jeder Injektion durch Trypan-Blau Färbung verifiziert und betrug 95 bis 100%. Die Tumorinjektion erfolgte subkutan in die rechte Flanke. Das Tumolvolumen wurde zweimal wöchentlich mit einer Schublehre gemessen und das Tumolvolumen nach der Formel $V = (a \times b^2) / 2$ berechnet, wobei a den größten und b den kleinsten Durchmesser darstellt. Bei wenig signifikanten Unterschieden zwischen der experimentellen und der Kontrollgruppe wurde auch das relative Tumolvolumen (bezogen auf das Tumolvolumen bei der ersten Messung) ermittelt.

4.16 Analyse der Immunantwort

4.16.1 *Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)*

Bicarbonat-Puffer	ELISA Waschpuffer	ELISA Blockierungspuffer	ABTS-Substratlösung
(pH 9,6) 70mM NaHCO ₃ 30mM NaCO ₃	0,05% Tween20 in PBS	5% FCS oder Milchpulver 0,05% Tween20 in PBS	0,5mg/ml ABTS 50mM Zitronensäure 17µl H ₂ O ₂ 30%

Zum Nachweis von Muzin oder Vakzinia spezifischen Antikörpern wurden in einem Volumen von 80µl Bicarbonatpuffer synthetisches Muzin-VNTR-60-mer Peptid (10µg/ml) oder Sukrose-gereinigte Vakzinia Viren (2×10^7 /ml) an Nunc-Maxisorb 96-Mikrotiterplatten gebunden (über Nacht, 4°C). Die mit Vakzinia beschichteten Platten wurden aus Sicherheitsgründen am nächsten Tag durch die Zugabe von 80µl 4% Paraformaldehyd inaktiviert (30min). Die Platten wurden 5 x mit ELISA Waschpuffer gewaschen und mit 150µl Blockierungspuffer blockiert (1h). 100µl einer Verdünnungsreihe der Seren

immunisierter Mäuse (aus Schwanzvenenpunktionen an Tag 19 bis 22 nach der letzten Vakzinierung) wurden in die Vertiefungen pipettiert und 1h bei RT inkubiert. Nach 5 weiteren Waschschritten erfolgte die Zugabe einer Verdünnung des Sekundärantikörpers in Waschpuffer (Peroxidase-anti-Maus-IgG, 1:4000). Nicht gebundener Sekundärantikörper wurde durch 5-maliges Waschen entfernt und die Farbreaktion durch Zugabe von 100µl frisch hergestellte ABTS Lösung eingeleitet. Nach 30min erfolgte die Messung der Absorption bei 405nm auf einem ELISA-Photometer.

4.16.2 Messung antigenspezifischer Zytotoxizität durch den Chrom-Freisetzungstest

Zur Detektion von Muzin-spezifischen CTL wurde das in einem Standard 4h-Chrom-Freisetzungstest während einer 4-stündigen Kokultur von Milzzellen (Effektorzellen) vakzinierter Mäuse (Effektorzellen) mit radioaktiv markierten MC38-MUC1 und MC38 Zielzellen freigesetzte $^{51}\text{Cr}^{2+}$ gemessen. Der Zytotoxizitätstest wurde sowohl mit frisch isolierten Milzzellen als auch mit 5 Tage in der Gegenwart von humanen IL-2 (40U/ml) und Antigen (Muzin-tandem-repeat-60mer oder bestrahlte MC38-MUC1 Tumorzellen im Verhältnis 1:5) durchgeführt. Dazu wurde die 5-fache Menge der für den Test benötigten Zielzellen in einem Volumen von 50µl RPMI resuspendiert und mit 1,85MBq [^{51}Cr]Natriumchromat markiert (90min, 37°C, 5%CO₂). Alle 15min wurden die Zellen durch Schütteln resuspendiert. Die Zellen wurden 3mal mit RPMI 10% FCS gewaschen (300g, 10min). Die genaue Zellzahl wurde durch Zählen einer parallel mitgeführten NICHT markierten Probe mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Bestimmung der durch die Effektorzellen induzierten Zytolyse (EF, experimentelle Freisetzung) wurden in Triplikaten 3000 markierte Zielzellen mit variierenden Mengen Effektorzellen (maximal 200-facher Überschuß) in 96-Loch Rundboden-Mikrotiterplatten in einem Volumen von 200µl kokultiviert (IMDM 10% FCS, 37°C, 4h). Parallel dazu wurden Triplikate von Zielzellen ohne Effektorzellen (SF, spontane Freisetzung) und von durch Zugabe von 1% Triton X-100 vollständig lysierte Zielzellen (MF, maximale Freisetzung) angesetzt. Um den Kontakt von Effektor- und Zielzellen zu erleichtern, wurde zuvor kurz zentrifugiert (3min, 200g). Nach der 4-stündigen Inkubation wurden die Zellen pelletiert (10min, 350g) und 100µl jedes Probenüberstandes auf 96-Loch Szintillatorplatte (LumaPlate-96) pipettiert. Nach dem Trocknen über Nacht wurden die Szintillatorplatten mit einem Topseal-Film verschlossen und die Radioaktivität in einem β -Szintillationszähler gemessen. Der Prozentsatz der spezifischen Lysis für jede Vertiefung nach der folgenden Formel berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lysis} = (\text{EF} - \text{SF} / \text{MF} - \text{SF}) \times 100\%$$

Aus den einzelnen Meßwerten wurde durch statistische Auswertung der Mittelwert sowie die Standardabweichung für jedes Effektor-Zielzellen Verhältnis berechnet.

4.16.3 Messung antigenspezifischer CTL durch intrazelluläre IFN-gamma Färbung

4.16.3.1 Aktivierung von antigenspezifischen CTL mit synthetischen Oligopeptiden

FACS-Puffer	Fixierungs-Puffer	Permeabilisierungs-Puffer
0,1% NaN ₃ 2% FCS in PBS	5% Paraformaldehyd in PBS	2% FCS 0,5% Saponin in PBS

Zur quantitativen Detektion von antigenspezifischen CTL wurden 19 bis 22 Tage nach der letzten Vakzinierung 5×10^6 Milzzellen der individuellen vakzinierten Mäuse in 96-Loch Rundboden-Mikrotiterplatten in Gegenwart von BrefeldinA und dem β -Gal-K^b immundominanten MHC-I Epitop ICPMYARV bzw. den auf ihre Fähigkeit zur Induktion von IFN-gamma in T-Zellen zu testenden Peptiden in einem Volumen von 280 μ l 6h aktiviert (37°C, 5%CO₂, in RPMI / 50 μ M 2-Mercaptoethanol / Antibiotika / 1% FCS / BrefeldinA / 2 bis 10 μ g/ml Oligopeptid oder Pools von bis zu 5 verschiedenen Oligopeptiden). Nach der Aktivierung wurden die Zellen zentrifugiert (400g, 5min), in einem Volumen von 25 μ l FACS-Puffer / 10% Rattenserum blockiert (20min auf Eis) und durch Zugabe von je 1 μ l Ratte-anti-Maus-CD8PE und Ratte-anti-Maus-CD3-Biotin in einem Volumen von 25 μ l gefärbt. Nach 30 Minuten auf Eis wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (400g, 5min) und mit 2 μ l Streptavidin-CyChrome in einem Volumen von 50 μ l FACS-Puffer gefärbt (30min auf Eis). Nach einmaligem Waschen und Zentrifugieren (400g, 5min) wurden die Zellpellets in 50 μ l PBS aufgenommen und in 96-Loch Spitzboden-Mikrotiterplatten mit 50 μ l Fixierungspuffer überführt. Mehrfaches auf- und ab pipettieren ist notwendig um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden. Nach 10min wurden die Zellen pelletiert. Alle folgenden Zentrifugationen fixierter Zellen wurden bei 1000g (10min) durchgeführt und der Überstand nicht durch Ausschütten sondern durch Absaugen entfernt, um den Verlust gering zu halten. Die fixierten Zellen wurden einmal in

Permeabilisierungspuffer gewaschen und in 25µl Permeabilisierungspuffer / 10% Rattenserum blockiert. Die intrazelluläre IFN-gamma Färbung erfolgte durch Zugabe von 1µl Ratte-anti-Maus-IFN-gamma-FITC in 25µl Permeabilisierungspuffer. Die Zellen wurden ein weiteres Mal in Permeabilisierungspuffer gewaschen und für die durchflußzytometrische Analyse in 600µl FACS-Puffer resuspendiert.

4.16.3.2 Aktivierung von antigenspezifischen CTL durch zelluläre Stimulierung

Bei herkömmlichen Zytotoxizitätstests wird meist durch eine mehrtägige oder -wöchige *in vitro* Kultur in Gegenwart von IL2 und Antigen, beispielsweise bestrahlte Tumorzellen oder Antigen-gepulste dendritische Zellen, versucht, spezifische CTL zu expandieren. In Anlehnung an diese Methoden wurde untersucht, ob durch eine zelluläre Stimulierung Antigen-spezifische CTL nachgewiesen werden können. Dazu wurden 5×10^6 Milzzellen vakzinerter Tiere mit 10^6 Stimulatorzellen in 24-Loch Zellkulturschalen für 20h in einem Volumen von 1,5ml kokultiviert (37°C, 5%CO₂, in RPMI / 50µM 2-Mercaptoethanol / Antibiotika / 1% FCS) und 6h vor der Ernte BrefeldinA (10µg/ml) zugegeben. Als Stimulatorzellen wurden MVA-infizierte syngene dendritische Zellen, Antigen-gepulste dendritische Zellen (24h in Gegenwart von 40µg/ml rekombinanter beta-Gal (Sigma) oder Muzin-60mer kultivierte DC) oder bestrahlte antigenexprimierende Tumorzellen verwendet (MCA205-beta-Gal und MC38-MUC1). Nach der Stimulierung wurden die Zellen abzentrifugiert und auf 96-Loch Mikrotiterplatten wie oben beschrieben gefärbt.

4.16.3.3 Durchflußzytometrische Analyse der gefärbten T-Zellen

Die Einstellung der Kompensation der verschiedenen Fluoreszenzen erfolgte mit einfach gefärbten (PE bzw. CyChrome) Milzzellen. Da die IFN-gamma-FITC gefärbten Zellen sehr seltene Ereignisse sind, wurde ersatzweise eine CD4-FITC gefärbte Probe zur Einstellung der Kompensation verwendet. CD3-negative Zellen wurden durch eine entsprechende Einstellung des Fluoreszenz-3-Schwellenwertes während der FACS-Analyse ausgeblendet und ausschließlich die Daten der T-Zell-Population gespeichert. Die Proben wurden möglichst vollständig bei maximal 3000 Partikel pro Sekunde innerhalb von ca. 7 Minuten eingelesen. Bei der Auswertung der Daten mit dem WinList-Programm wurden im Fluoreszenz 1 (IFN-gamma-FITC) gegen Fluoreszenz 2 (CD8-PE) Diagramm das Fenster zur Darstellung IFN-gamma produzierender Zellen so gewählt, daß bei den Tieren der negativen Kontrollgruppen etwa 0.01 bis maximal 0,02% aller T-Zellen darin lagen. Durch die geringe Frequenz an IFN-gamma produzierenden Zellen ist die Analyse von mindestens 80 000 CD8 bzw. CD4 T-Zellen um ein statistisch abgesichertes Ergebnis zu

erhalten. Tiere in der experimentellen Gruppe, mit mehr IFN-gamma produzierenden CTL als der Mittelwert der Kontrolltiere plus dreifacher Standardabweichung haben eine eindeutige antigenspezifische zelluläre Immunantwort aufgebaut.

4.17 Software zur Datenverarbeitung

Die dargestellten „Treppen“-Diagramme zur Darstellung des Tumorwachstums wurden mit dem Programm GraphPad-Prism erstellt. Mit Hilfe dieses Programms wurden ebenfalls die angegebenen P-Werte zum Vergleich der Wachstumskurven mit einer Kontrollgruppe berechnet. Der P-Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit, ob Beobachtete Unterschiede zwischen Experimentellen und Kontroll-Gruppen signifikant sind oder auch zufallsbedingt sein können. Bei einem Wert von 0,05 oder weniger wird von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen.

5 Ergebnisse

5.1 Klonierung und Überprüfung der hergestellten Vektoren

Klonierung der DNA und MVA-Vektoren:

Die Herstellung der für die Generierung von rekombinanten Viren notwendigen Transfervektoren sowie der Vektoren für die DNA-Vakzinierung erfolgte mit den im Methodenteil beschriebenen Standardtechniken. Die Klonierung von puc-MUC1 (puc2LZp75#14-MUC1) und pCI-MUC1 erforderte den Einsatz elektrokompetenter Bakterien mit anschließender Analyse einer großen Zahl von Klonen (>200) durch alkalischen Schnellaufschluss in 96-Loch Mikrotiterplatten. Sämtliche Vektoren wurden vor der Ligation dephosphoryliert um eine intramolekulare Religation des Vektors zu verhindern. Die Vektoren puc2LZp75#14 und pCI sind in Abb. 5-1 und 5-2 dargestellt.

Zur Generierung von **puc-MUC1** wurde die vollständige Mucin-cDNA durch Restriktionsspaltung mit Hind-III aus dem Vektor RcCMV-MUC1 geschnitten, durch T4-DNA-Polymerase geglättet und in den durch Sma-I-Restriktionsspaltung linearisierten Transfervektor puc2LZp75#14 eligiert. Zur Herstellung von **pCI-MUC1** wurde das die Mucin-cDNA enthaltende Hind-III / BamH-I - Fragment aus RcCMV-MUC1 zunächst in den mit den Restriktionsendonucleasen Hind-III und BamH-I geschnittenen Vektor pBK-CMV subkloniert. Aus diesem Vektor konnte aufgrund der kompatiblen Enden das Xho-I-BssH-II-Fragment mit der Mucin cDNA in den mit Mlu-I und Xho-I geschnittenen Vektor pCI kloniert werden. Der Vektor **puc-CEA** (puc2LZp75#14-CEA) wurde durch die Klonierung des mit Klenow-Polymerase aufgefüllten, die CEA-cDNA enthaltenden EcoR-I Fragments aus dem Plasmid AdCEA/IL12 in den mit Sma-I geschnittenen Transfervektor puc2LZp75#14 hergestellt. Zur Generierung von **pCI-CEA** wurde das EcoR-I / Not-I - Fragment aus AdCEA/IL12 in den ebenfalls mit EcoR-I und Not-I geschnittenen Vektor pCI kloniert. Der Vektor **puc-GFP** (puc2LZp75#14-GFP) wurde durch die Umklonierung des mit T4-DNA-Polymerase geglätteten Hind-III - Not-I - Fragments aus RcCMV-GFP (Dagmar Breitfeld, MDC-Berlin) in die Sma-I Schnittstelle von puc2LZp75#14 generiert. Die LacZ-cDNA wurde zur Generierung von **pCI-LacZ** aus dem Vektor pcDNA3.1/His B/LacZ ein pCI subkloniert. Dazu wurde pcDNA3.1/His B/LacZ mit Hind-III geschnitten und die Schnittstellen durch T4-DNA-Polymerase geglättet. Die beta-Gal cDNA wurde aus dem gereinigten linearisierten Vektor durch Nachschneiden mit Not-I gewonnen und in den mit Sma-I und Not-I geschnittenen Vektor pCI kloniert.

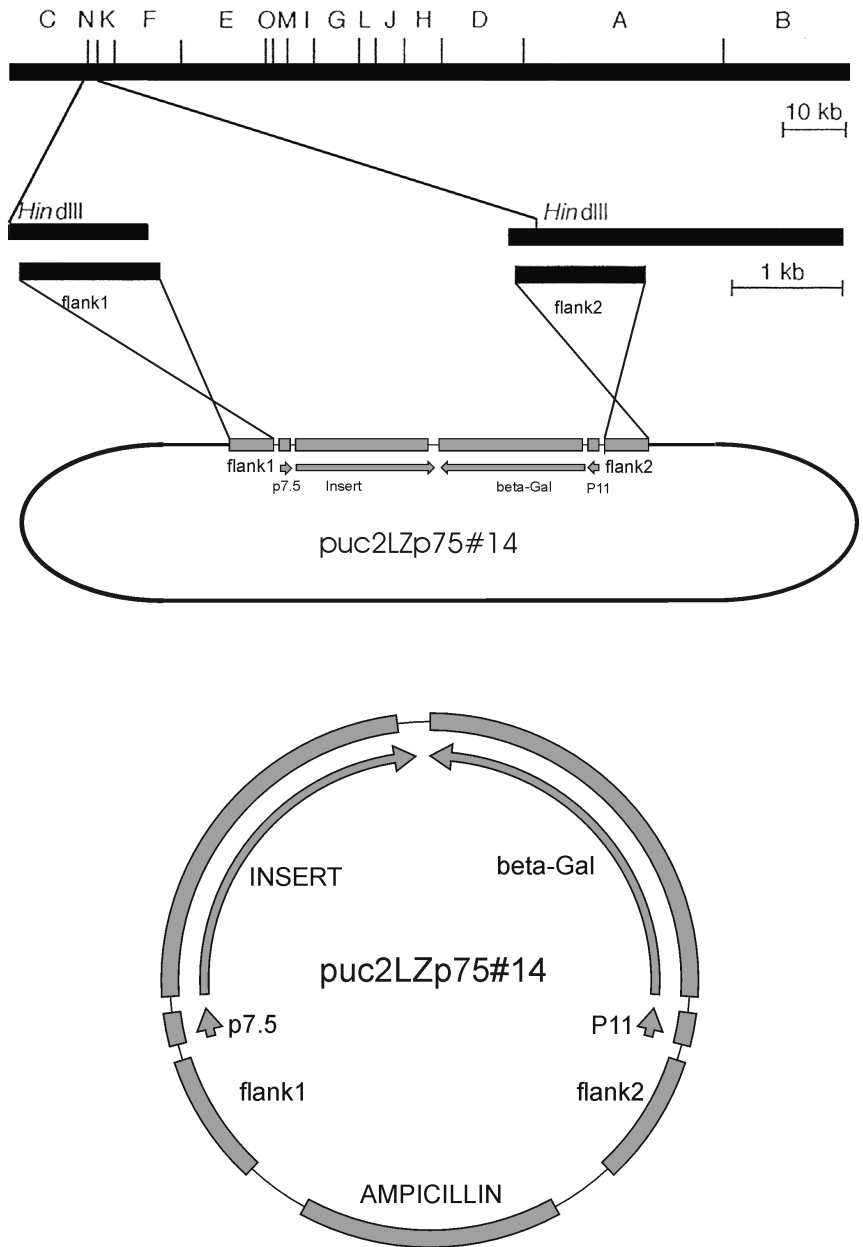


Abbildung 5-1: Graphische Darstellung des Transfervektors zur Klonierung rekombinanter MVA-Viren durch homologe Rekombination in BHK-Zellen an den zur Virus-DNA homologen Sequenzen *flank1* und *flank2* im Transfervektor. Die Darstellung des MVA-Genoms erfolgt durch die nach der Größe geordneten Hind-III-Fragmente. Die Insertion erfolgt in Deletion II im Hind-III-Fragment N.

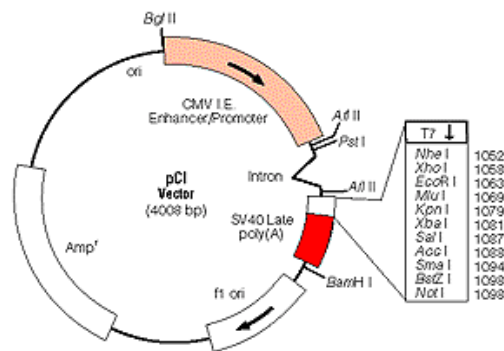


Abbildung 5-2: pCI-Vektorkarte

Zur Gewährleistung einer langfristigen und hohen Expressionsrate werden die in die multiple Klonierungsstelle inklonierten Gene unter der Kontrolle des CMV-Enhancer/Promotors exprimiert. Weitere Merkmale sind das kurze Intron vor der Klonierungsstelle sowie die SV40-Polyadenylierungssequenz.

Überprüfung der klonierten Plasmid-Vektoren und MVA-Viren:

Die Überprüfung der für die Vakzinierungen und Kontrollexperimente hergestellten DNA- und viralen Vektoren erfolgte durch Sequenzierung sowie durchflußzytometrische Analysen und *Western blotting* unter Verwendung von infizierten bzw. transient transfizierten Zellen. Die **Sequenzierung** des Transfervektors puc2LZp75#14 bestätigte die korrekte Insertion von Muzin, GFP und CEA und die Übereinstimmung mit den entsprechenden Genbank Eintrag (siehe Anhang). Beim humanen Muzin1 entsprechen (durch eine eingeführte Not-I-Schnittstelle nach dem ATG-Codon) die ersten 6 Aminosäuren nicht dem Genbank-Eintrag. Diese gehören jedoch zum Signalpeptid, welches im prozessierten membranständigen Molekül abgespalten wird. Trotz der Änderung der Sequenz verläuft der intrazelluläre Transport normal. Die Ergebnisse der **Durchflußzytometrie** (Abb. 5-3) bestätigen, daß DNA- und viral kodiertes Muzin membranständig exprimiert wird.

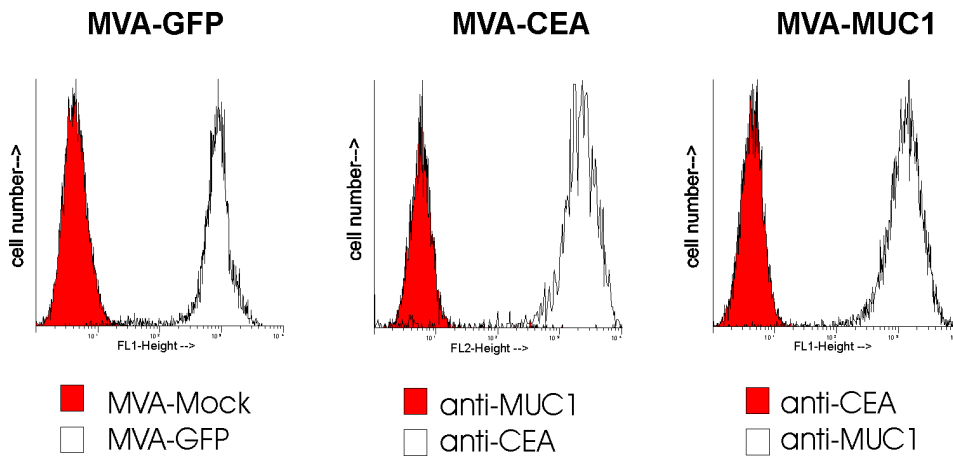


Abbildung 5-3: Nachweis der Expression von GFP, CEA und Muzin in MVA infizierten CEF-Zellen. Die GFP Expression ist ohne Antikörper-Färbung meßbar (links). Der Nachweis von Muzin und CEA auf der Zelloberfläche infizierter CEF-Zellen erfolgte durch Färbungen und Kontrollfärbungen mit den Antikörpern anti-MUC1 (BC2), anti-CEA (D14-HD-11) und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern.

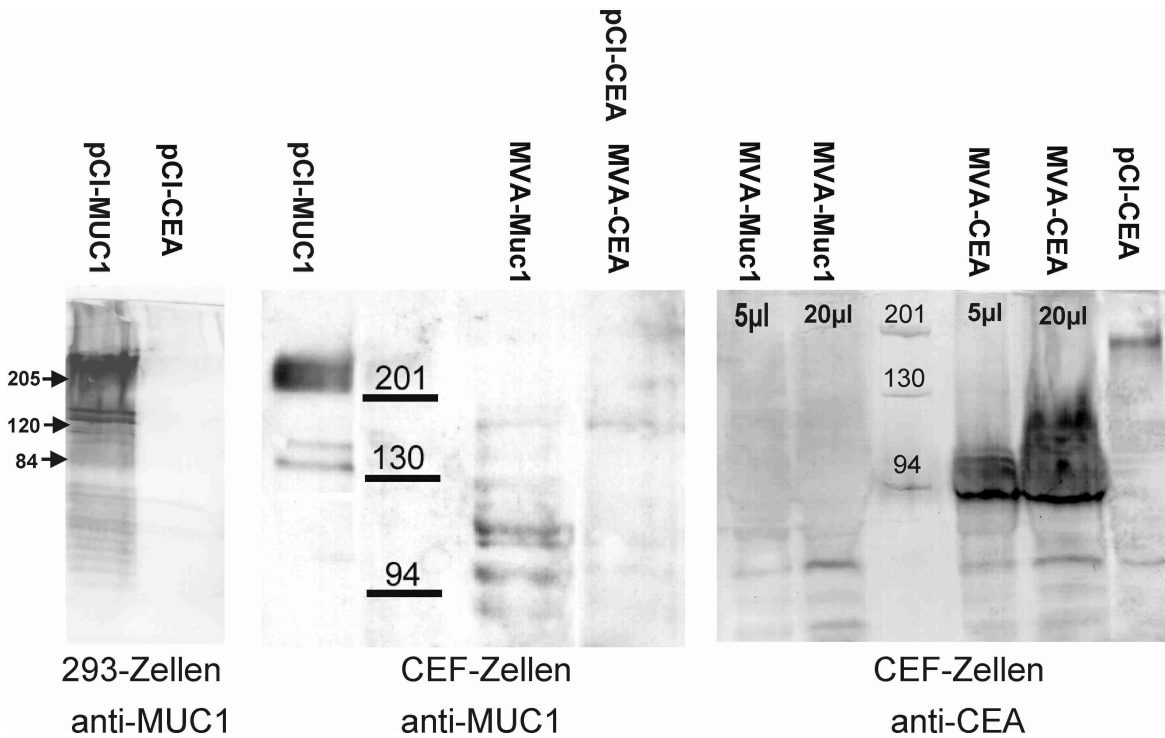


Abbildung 5-4: LINKS: Nachweis von Muzin in mit pCI-Muc1 transient transfizierten 293 Zellen durch Färbung mit BC2 und alkalischer Phosphatase-konjugiertem sekundären Antikörper (AP-System). Zur Kontrolle wurden äquivalente Mengen mock-transfizierte Zellen (pCI-CEA) aufgetragen. MITTE: Nachweis von Muzin in mit pCI-MUC1 transient transfizierten und MVA-infizierten CEF-Zellen. Der Nachweis erfolgte durch Färbung mit BC2 und Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (ECL-System). Zur Kontrolle wurden äquivalente Mengen aus MVA-CEA infizierten CEF-Zellen aufgetragen. RECHTS: Nachweis von CEA in MVA-CEA infizierten oder mit pCI-CEA transient transfizierten CEF-Zellen. Die Färbung erfolgte mit anti-CEA D14-HD-11 und AP-konjugiertem Sekundärantikörper. Als Kontrolle dienten äquivalente Mengen MVA-Muc1 infizierter CEF-Zellen. Die einzelnen Banden werden im Text erläutert.

Im **Western blot** (Abb. 5-4 links) erscheint das durch den DNA-Vektor pCI kodierte Muzin als breite Bande bei >200 KDa sowie als eine kleinere Doppelbande bei ca. 130KDa. Die Doppelbande wurde in Studien mit Muzin-exprimierenden Retroviren als unglykosyliertes Muzin-Vorläufer-Protein (vor und nach der Abspaltung des Signalpeptids) beschrieben, die Bande bei >200KDa entspricht dem fertig prozessierten, glykosylierten Muzin (Henderson et al., 1998). In MVA-MUC1 infizierten Zellen sind ebenfalls mehrere, aber deutlich kleinere Banden sichtbar. Der Nachweis erforderte hier den Einsatz der ECL-Methode (*enhanced chemoluminescence*). Die geringere Bandenintensität und das geringere Molekulargewicht von Muzin in MVA-MUC1 infizierten CEF-Zellen im Vergleich zu mit pCI-MUC1 transfizierten 293-Zellen ist vermutlich auf den Verlust einiger der VNTR (*variable number tandem repeats*) durch homologe Rekombination während der Klonierung rekombinanter MVA-Viren zurückzuführen. Der monoklonale anti-Muzin-Antikörper BC-2 erkennt ein Epitop innerhalb der VNTR-Sequenz.

Interessanterweise ist bei den CEA-kodierenden MVA-Vektoren ebenfalls eine Abnahme des Molekulargewichts bei viral kodierten Proteinen zu beobachten (Abb. 5-4 rechts), obwohl CEA keine repetitiven Sequenzen enthält und daher ein Verlust von Aminosäuren durch Rekombination repetitiver DNA Segmente nicht zu erwarten ist. Das Molekulargewicht von ca. 180 KDa sinkt bei viral kodiertem CEA auf 90 KDa. Wie Muzin ist auch CEA ein extrem stark glykosyliertes Molekül. Bei dem nicht-glykosylierten Protein beta-Galactosidase ist dieser Effekt nicht zu beobachten: sowohl durch Plasmid Vektoren als auch durch MVA kodierte beta-Galactosidase zeigen ein identisches Laufverhalten im SDS-Gel (Daten nicht gezeigt). Durch rekombinante Vakzinia Viren kodierte Proteine sollten normal glykosyliert und prozessiert werden (Moss, B. et al. in: *Current Protocols in Molecular Biology*, 1998, Band IV, Kapitel 16.15). Es gibt allerdings Publikationen, die eine durch die Vakzinia Infektion induzierte Störung der Glykosylierung und eine damit verbundene Abnahme des Molekulargewichts der durch Vakzinia kodierten Proteine beschreiben (Bernhardt et al., 1994). Auf die Bedeutung des Verlusts von Teilen der *tandem repeat* Sequenz für die Entwicklung von Vakzinen auf der Basis von Muzin wird in der Diskussion eingegangen.

5.2 Generierung und Infektion muriner und humaner dendritischer Zellen

Da Vakzinen auf der Basis dendritischer Zellen gegenwärtig zu den aussichtsreichsten Tumorvakzinen gehören, wurde die Infizierbarkeit humaner und muriner dendritischer Zellen, die Expression der Antigene GFP und Muzin in infizierten dendritischen Zellen und der Einfluß der MVA-Infektion auf den Phänotyp und Reifezustand untersucht.

5.2.1 *In Vitro* Generierung von murinen und humanen dendritischen Zellen

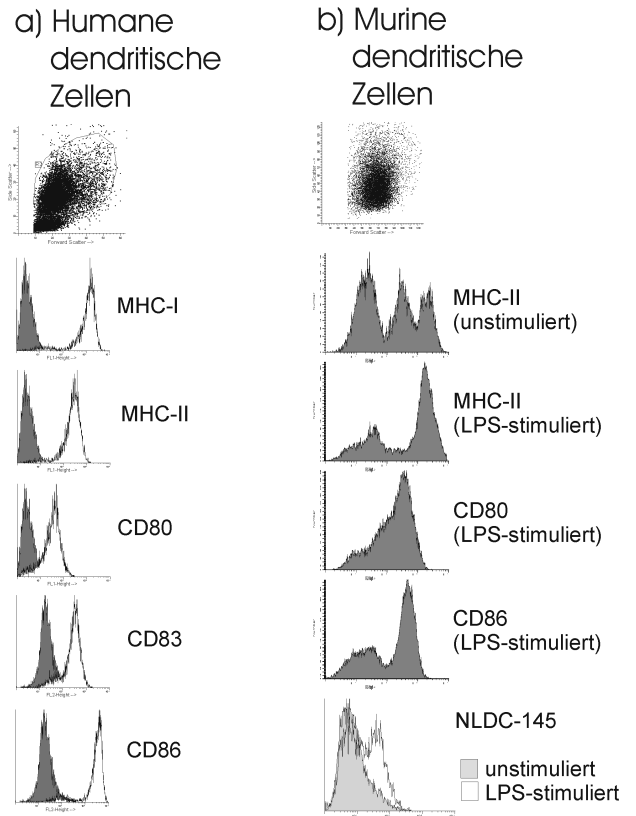
Da kein einzelner bisher bekannter Oberflächenmarker dendritische Zellen eindeutig charakterisiert, wurde zur Analyse der *in vitro* generierten dendritischen Zellen eine Kombination verschiedener Marker eingesetzt (MHC-II, CD80, CD86, CD83 (humane DC), NLDC-145 (murine DC), (siehe Abb. 5-5). Sowohl die humanen als auch die murinen DC-Kulturen sind nicht frei von anderen Zelltypen. Bei aus humanen Monozyten ausdifferenzierten dendritischen Zellen beträgt der Gehalt an DC ca. 80%. Die dendritischen Zellen können jedoch aufgrund ihrer Größe (*forward scatter* oder Vorwärts-Streulicht) und Granularität (*side scatter* oder Seitwärts-Streulicht) bei der durchflußzytometrischen Analyse von anderen Zelltypen getrennt werden. Bei aus CD34+ DC-Vorläuferzellen (aus Knochenmark) generierten murinen dendritischen Zellen werden auch Granulozyten- und Makrophagen-Vorläuferzellen unter Einfluß von *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) zur Proliferation angeregt. Der Gehalt an dendritischen Zellen betrug 30 bis 60% wobei ein Ausgrenzen dieser nicht-dendritischen-Zellen durch andere Vorwärts/Seitwärts-Streulicht-Eigenschaften hier nicht möglich ist. Eine eindeutige Bestimmung des Anteils von DC erfordert eine terminale Reifung (z.B. durch LPS). Reife DC erkennt man anhand der starken Expression von CD86 und MHC-II sowie der Expression von NLDC-145. Auch andere Zelltypen, z.B. Makrophagen, exprimieren einige der für dendritische Zellen charakteristischen Marker, aber in geringeren Mengen als reife dendritische Zellen.

Abbildung 5-5: Phänotyp der aus humanen PBMC (a) oder aus Maus-Knochenmark (b) ausdifferenzierten dendritischen Zellen.

a) Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen nach 24-stündiger terminaler Reifung durch CD40Ligand. Die jeweiligen Isotyp Kontrollen sind grau schattiert. Die dendritischen Zellen liegen im Vorwärts/Seitwärts-Streulicht-Diagramm in dem angezeigten Fenster. Darunter erkennt man die Population der kleineren, weniger granulären Lymphozyten.

b) Expression von Oberflächenmarkern auf murinen DC vor und nach 24-stündiger Reifung mit LPS. Die Reifung erhöht den Anteil an Zellen, die sehr viel MHC-II exprimieren und induziert die Expression des DC-Markers NLDC-145. Im Gegensatz zu humanen dendritischen Zellen lassen sich die murinen dendritischen Zellen nicht im Vorwärts/Seitwärts-Streulicht-Diagramm von anderen Zellen unterscheiden.

X-Achse: Vorwärts-Streulicht (oben) bzw. Fluoreszenzintensität (unten), Y-Achse: Seitwärts-Streulicht (oben) bzw. Zellzahl (unten)



5.2.2 Bestimmung der optimalen Infektionsbedingungen

Die optimalen Bedingungen zur Infektion muriner (Abb. 5-6) und humaner (Abb. 5-7) dendritischer Zellen wurden in unabhängigen Experimenten unter Verwendung von MVA-GFP und MVA-MUC1 ermittelt. Die höchsten Infektionsraten bei hoher Überlebensrate wurden bei zweistündiger Infektion (37°C, 5%CO₂) bei sehr hoher Zelldichte (z.B. 5 Millionen Zellen in 0,5 ml), gelegentlichem Resuspendieren und anschließendem Waschen der Zellen erreicht. Bei einer MOI von 25 bis 50 lassen sich (bei einer Überlebensrate von ca. 70%) 75 bis 90% der humanen dendritischen Zellen infizieren. Die Infektion der murinen DC erfolgt optimal bei einer niedrigen MOI (1-5), da bei einer höheren MOI die Lebensfähigkeit stark abnimmt. Die niedrigere Infektionsrate (ca. 60%) ist vermutlich auf den relativ hohen Anteil von Zellen, die keine dendritischen Zellen sind, zurückzuführen. Diese "nicht-dendritischen Zellen" (Lymphozyten bzw. Granulozyten oder Makrophagen) sind auch in humanen DC-Kulturen vorhanden und sind – ebenso wie frisch isolierte PBMC - nur schlecht infizierbar (maximal 10%, Daten nicht gezeigt). Die klonierten MVA-Viren infizieren *in vitro* generierte dendritische Zellen sehr effizient, die Expression von Muzin und GFP ist aber wesentlich geringer als die Expression in permissiven Wirtszellen (CEF, vergleiche Abb. 5-3, 5-6 und 5-7).

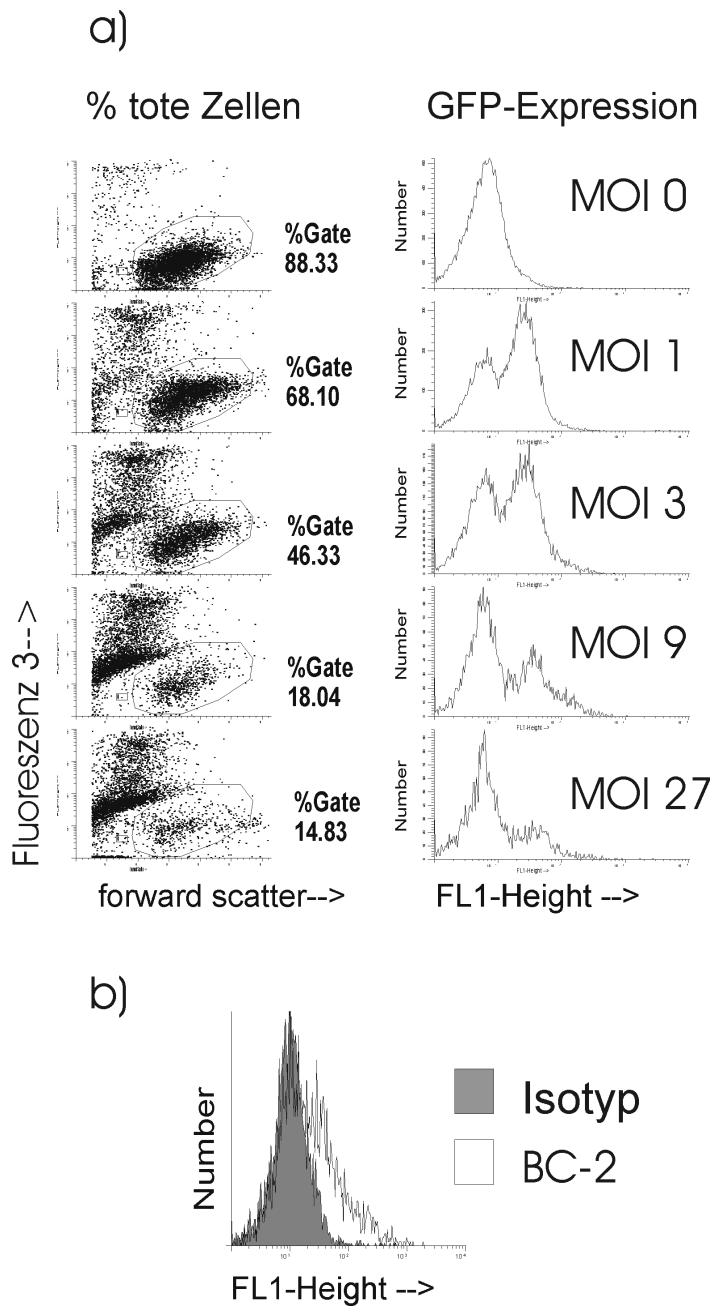


Abbildung 5-6: Expression von GFP (a) und Muzin (b) in (bzw. auf) murinen dendritischen Zellen 24 Stunden nach der Infektion mit MVA-GFP. Die rasche Abnahme der Lebensfähigkeit bei hoher MOI wird durch die Darstellung von *Vorwärts-Streulicht* und Fluoreszenz 3 nach Färbung mit Propidiumiodid deutlich (a). Der Nachweis von Muzin (b) erfolgte durch Färbung mit dem Antikörper BC2 (hell) und der Isotypkontrolle (schattiert).

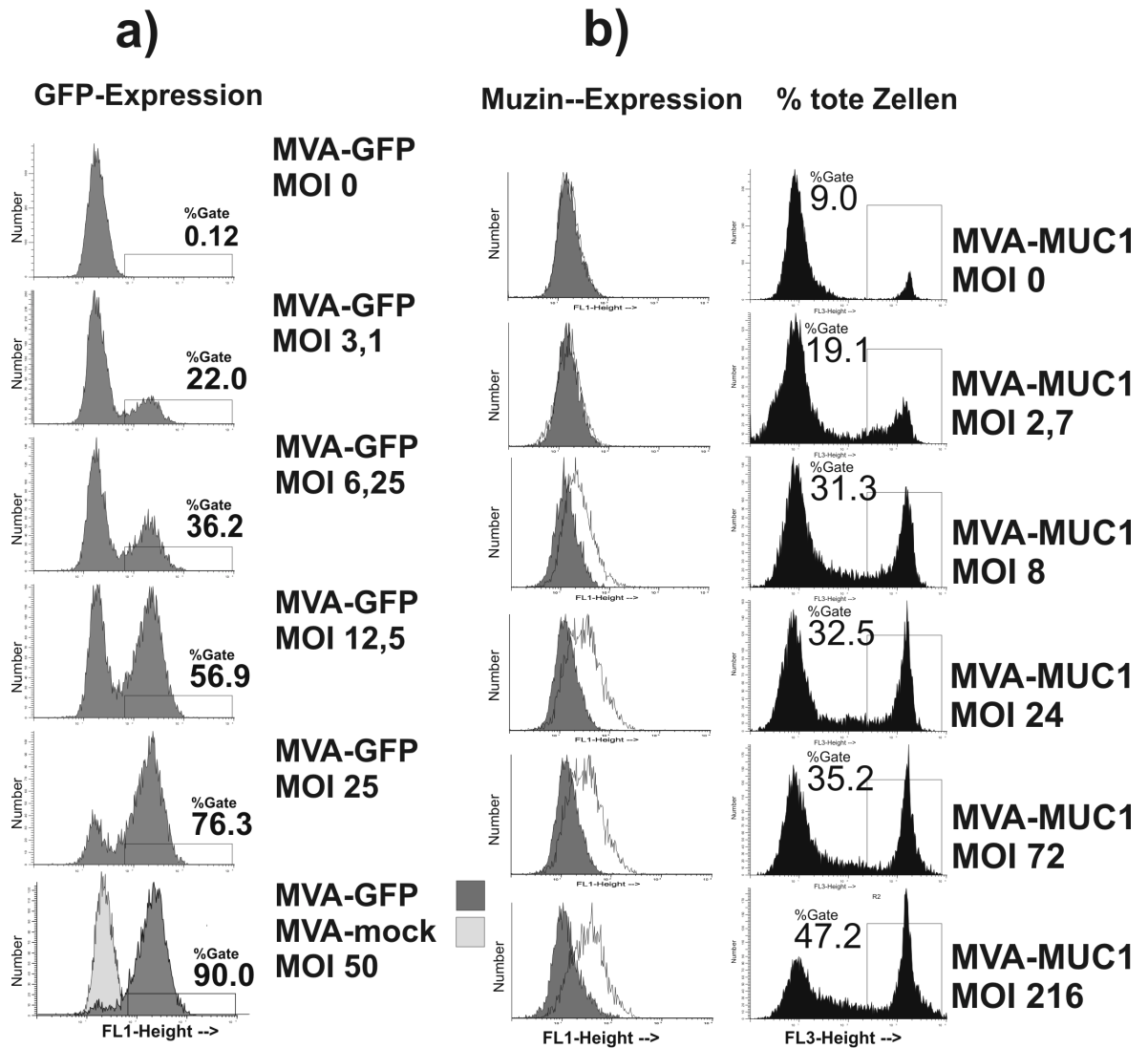


Abbildung 5-7: Bestimmung der optimalen Infektionsbedingungen und Expression von GFP und Muzin in MVA-GFP (a) und MVA-MUC1 (b) infizierten humanen dendritischen Zellen 20h nach der Infektion. Die GFP Expression ist direkt meßbar. Als Kontrolle dienten nicht infizierte (MOI 0) und mock-infizierte dendritische Zellen. Die Expression von Muzin wurde durch Färbung mit anti-Mucin BC2 Antikörper (hell) und Isotypkontrolle (schattiert) nachgewiesen. Der Anteil an toten Zellen wurde durch Färbung mit Propidiumiodid bestimmt.

X-Achse: Fluoreszenz-Intensität, Y-Achse: Zellzahl

5.2.3 Die terminale Reifung von infizierten und nicht-infizierten dendritischen Zellen

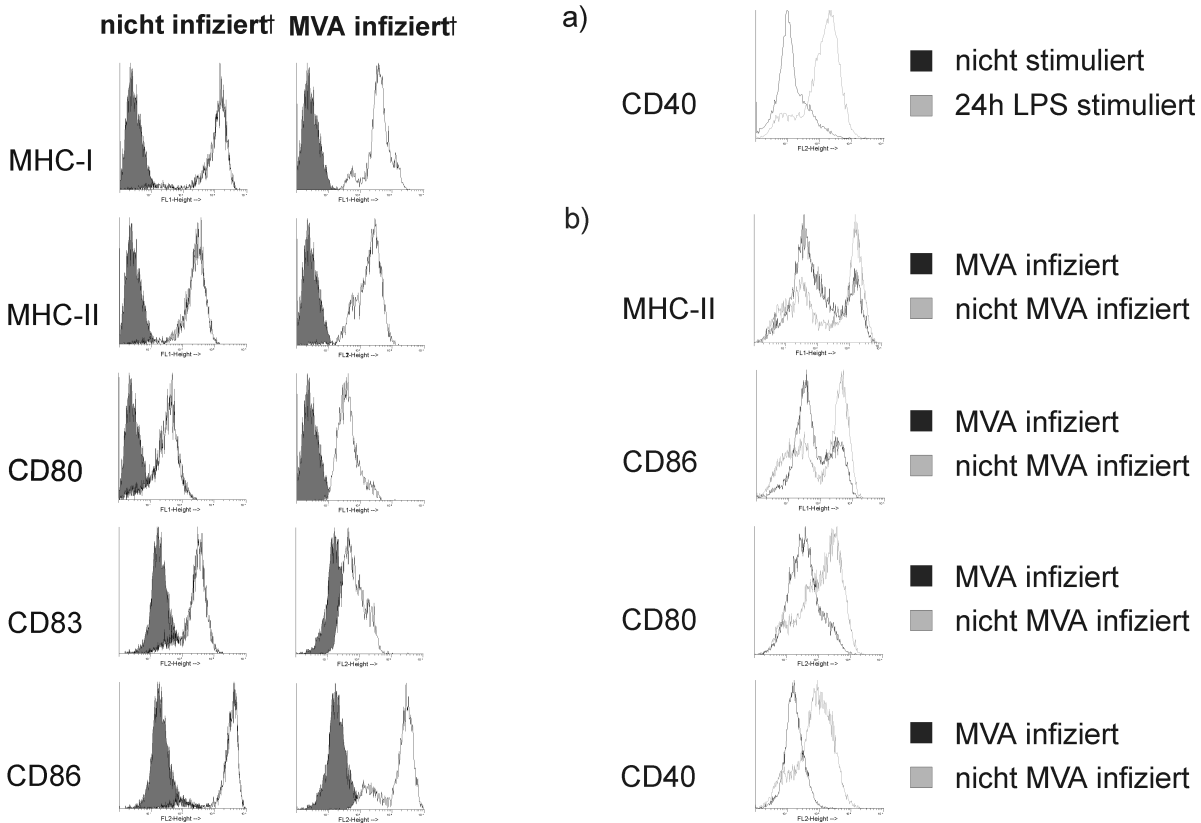


Abbildung 5-8: Der Einfluß der MVA Infektion auf die terminale Reifung humaner (linke Abbildung) und muriner (rechte Abbildung) dendritischer Zellen.

LINKS: Durch CD40Ligand induzierte Reifung humaner dendritischer Zellen. Die Infektion (MOI 50) inhibiert die Hochregulation von CD83.

RECHTS: (a) Hochregulation der Expression von CD40 auf murinen dendritischen Zellen durch 24h terminale Reifung mit LPS (b) Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen auf MVA-infizierten (MOI 3) und nicht-infizierten Zellen nach 24h terminaler Reifung mit LPS und CD40Ligand: Eine Infektion verhindert die Hochregulation von CD80 und CD40.

X-Achse: Fluoreszenz-Intensität, Y-Achse: Zellzahl

Nach sieben- bis neuntägiger Kultur muriner oder humaner dendritischer Zellen kann eine terminale Reifung der dendritischen Zellen durch Aktivierung mit LPS oder CD40Ligand induziert werden. Diese Reifung induziert die Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86), MHC-Molekülen sowie CD83 auf humanen DC und NLDC-145 murinen DC. LPS bewirkt außerdem die Hochregulation von CD40 auf dendritischen Zellen. Eine MVA Infektion inhibiert die CD40Ligand-induzierte Hochregulation von CD83 in humanen dendritischen Zellen und die Hochregulation von CD40 und CD80

durch LPS bzw. CD40Ligand in murinen dendritischen Zellen (siehe Abb.5-8). Ähnliche Effekte auf die Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD83 wurden in Studien zur Anwendung von (replikationskompetenten) Vakzinia Viren zum Gentransfer in dendritische Zellen beobachtet, während der Einfluß auf die Expression von CD40 noch nicht publiziert wurde. Zwei unabhängige Experimente zur Untersuchung des zytopathischen Effektes in humanen und murinen dendritischen Zellen lieferten vergleichbare Ergebnisse. Auf die Bedeutung der beobachteten Inhibition der Reifung in MVA-infizierten DC für die Anwendung von MVA in der Immuntherapie wird in der Diskussion näher eingegangen.

5.3 *In vivo* Vergleich von DNA, MVA und MVA-infizierten dendritischen Zellen im MC38 - C57BL/6 Modell

Die murine Kolon-Karzinom Zelllinie MC38 („MC38-WT“) sowie MC38-MUC1 und MC38-CEA wurden uns freundlicherweise von Dr. J. Schlom (NIH, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt. Durch retroviralen Gentransfer wurde die cDNA der humanen Tumorantigene Muzin und CEA stabil integriert (Lorenz et al., 1999). Aufgrund der genetischen Instabilität von *in vitro* kultivierten Zelllinien wurden zunächst für alle geplanten Experimente ausreichende Vorräte der Zelllinien hergestellt. Abweichungen im *in vivo* Wachstumsverhalten müssen unbedingt vermieden werden, um die Vergleichbarkeit verschiedener Experimente gewährleisten zu können. Die optimale Dosis, die bei subkutaner Injektion in 100% aller Tiere innerhalb von 4 Wochen zu soliden Tumoren an der Injektionsstelle führt, wurde zuvor experimentell bestimmt (Hagen Kulbe, MDC-Berlin und HU-Berlin). In den Abbildungen wird der Tag der Tumordinjektion als Tag 0 bezeichnet. Alle Tiere erhielten wurden zweimal vakziniert (*priming* und *boosting*). Die dabei verwendeten Vakzinen sind in den Abbildung, durch einen Querschnitt getrennt, angegeben (z.B. DNA/MVA), wobei das *priming* 14 Tage, (Tag -14) und das *boosting* 4 Tage (Tag -4) vor der Vakzinierung durchgeführt wurde (sofern nicht anders angegeben). Zur DNA-Vakzinierung wurden 50µg DNA in 50µl PBS intramuskulär injiziert. Mit MVA oder dendritischen Zellen vakzinierte Tiere erhielten eine intravenöse Verabreichung der angegebenen Dosis in einem Volumen von 100µl PBS.

5.3.1 Induktion von langfristiger Tumormunität durch pCI-MUC1-DNA Vakzinierung

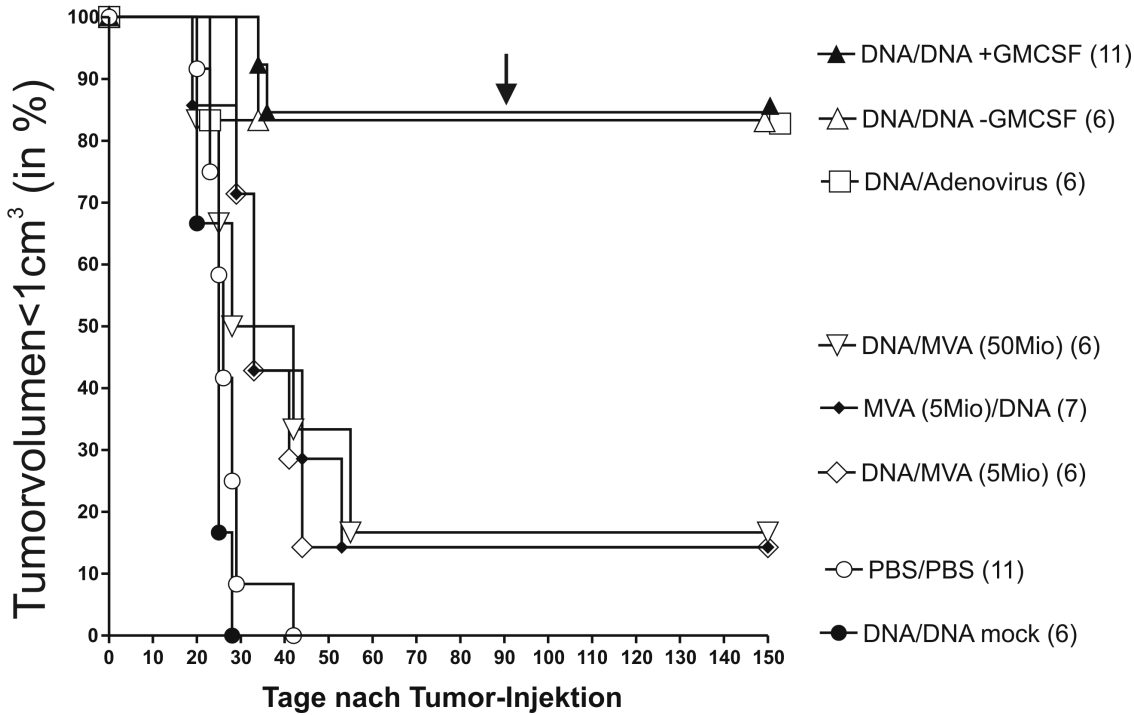


Abbildung 5-9: Ergebnisse der *in vivo* Versuche zum Einsatz der pCI-MUC1 und MVA-MUC1-Vektoren als prophylaktische Tumorstoffe im MC38-MUC1 / C57BL/6-Modell. Dargestellt ist der Zeitpunkt, an dem das Tumorstoff 1cm³ erreichte. Zum Vergleich ist das Ergebnis einer Adenovirus Vakzine im gleichen Tumorstoff Modell dargestellt. Die Tiere erhielten 50µg DNA bzw. verschiedene Dosen MVA Virus in der angegebenen Reihenfolge. 6 durch pCI-MUC1 vor MC38-MUC1 Tumoren geschützte Tiere erhielten am Tag 90 eine erneute Injektion von 10⁵ Zellen MC38-MUC1 (Pfeil). Die Zahl der Tiere pro Gruppe ist in der Legende in Klammern angegeben.

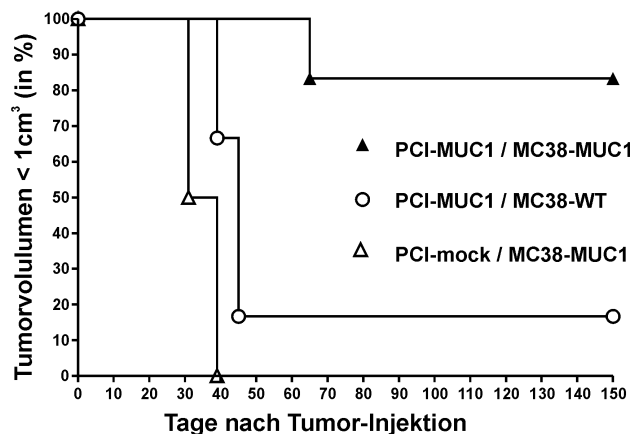


Abbildung 5-10: Wiederholung der in Abb. 5-9 dargestellten DNA-Vakzinierung. Zur zusätzlichen Kontrolle der Spezifität der pCI-MUC1-DNA Vakzine erhielt eine Gruppe eine gleiche Dosis (10⁵ Zellen) MC38 (Wildtyp) Zellen (6 Tiere pro Gruppe).

Zwei intramuskuläre Injektionen schützten 85% aller Tiere vor einer letalen Dosis MC38-MUC1 Tumorzellen ($p < 0,001$, Abb. 5-9). Alle Tiere in den Kontrollgruppen (PBS oder pCI-mock) entwickelten Tumore und wurden getötet, wenn der Tumor ein Volumen ein Volumen von 1cm^3 nach 28 bis 40 Tagen erreicht hatte. Als mock-DNA wurde pCI-CEA verwendet. Die Koinjektion von 50ng rekombinatem murinem GM-CSF (Promocell) zur Rekrutierung von APC an der Einstichstelle konnte die Schutzwirkung nicht weiter erhöhen. Eine zweite Injektion der gleichen Dosis MC38-MUC1 in 5 durch pCI-MUC1 vor Tumorstadium geschützten Mäusen nach 90 Tagen führte ebenfalls nicht zur Entwicklung von Tumoren. Die Schutzwirkung der pCI-MUC1 Vakzine ist vergleichbar mit der Tumormunität, die durch eine adenovirale Vakzine (Hagen Kulbe, MDC-Berlin und HU-Berlin, persönliche Kommunikation) im gleichen Tumormodell entsteht (*priming* mit $50\mu\text{g}$ pCI-MUC1 und *boosting* mit intramuskulärer Injektion von 5×10^8 PFU Adenovirus-MUC1). Die Wirksamkeit und Spezifität der pCI-MUC1-DNA-Vakzinierung wurde in einem weiteren unabhängigen Experiment bestätigt. In diesem Experiment wurde die injizierte DNA auf beide Oberschenkelmuskeln aufgeteilt (je $25\mu\text{g}$) und eine zusätzliche Kontrollgruppe, die eine äquivalente Dosis MC38 (Wildtyp) Tumorzellen erhielt, eingeführt (Abb. 5-10). Die Ergebnisse entsprechen exakt dem in Abb. 5-9 dargestellten Experiment. Das Wachstum von MC38-WT Tumorzellen in pCI-MUC1 vakzinierten und von MC38-MUC1 in mit pCI-mock DNA vakzinierten Mäusen in 5 von 6 Tieren ist ein weiterer Nachweis der Antigen-spezifität der DNA-Vakzine.

5.3.2 Induktion von Tumormunität durch pCI-CEA-DNA Vakzinierung

Die Vakzinierung von Mäusen mit pCI-CEA und anschließender Injektion von CEA-exprimierenden MC38 Tumorzellen (10^6 Zellen) führt zu ähnlichen Ergebnissen. 2 von 6 Mäusen entwickelten einen Tumor im Vergleich zu 5 von 6 Mäusen in der Kontrollgruppe (mit PBS vakzinierte Mäuse, $p = 0.0195$, Abb. 5-11).

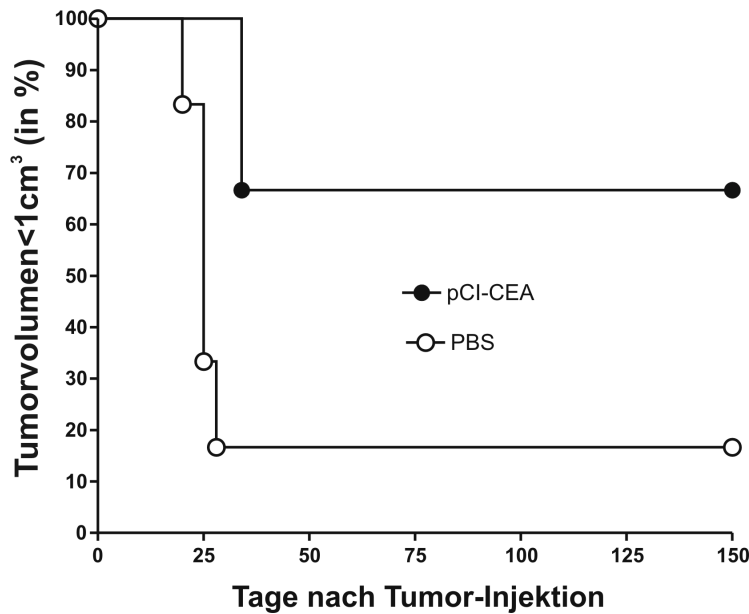


Abbildung 5-11: Wie in Abb. 5-9 erläutert, sind hier die Ergebnisse der pCI-CEA DNA-Vakzine im MC38-CEA / C57BL/6 Modell dargestellt (6 Tiere pro Gruppe).

5.3.3 Induktion von Tumorimmunität durch MVA-MUC1 Vakzinierung

Im Gegensatz zur reinen DNA-Vakzinierung wird durch die Kombination von DNA (*priming*) und 5 Millionen PFU MVA (boosting) Vakzinierung nur eine Verlangsamung des Tumorwachstums erreicht (Abb. 5-9). Eine vor einer letalen Tumordosis schützende Immunität entsteht bei weniger als 20% aller Tiere. Die Verabreichung von DNA und MVA in umgekehrter Reihenfolge oder die Erhöhung der MVA Dosis um den Faktor 10 führt zu keinem anderen Ergebnis. Die Beobachtung, daß kein dosisabhängiger Effekt vorliegt, läßt vermuten, daß die Verlangsamung des Tumorwachstums im Vergleich zu den mock-Kontrollgruppen möglicherweise auf das *priming* mit pCI-MUC1 zurückzuführen ist.

5.3.4 Induktion von Tumorimmunität durch eine therapeutische pCI-MUC1-DNA-Vakzinierung

Wie in der Einleitung erwähnt sind aus ethischen Gründen nur bei Patienten mit Tumorerkrankungen im fortgeschrittenen Stadium die Risiken einer klinischen Phase I / II Studie vertretbar. Die Wirksamkeit der pCI-MUC1 DNA-Vakzine wurde daher in einem therapeutischen Modell 7 Tage nach der Tumordinjektion verabreicht. Zu diesem Zeitpunkt

waren bereits solide Tumore mit einem durchschnittlichen Volumen von $0,16 \text{ cm}^3$ und einem Durchmesser von 6-7mm gewachsen. Ein signifikanter Effekt auf die Überlebensrate oder das Tumorstadium konnte in diesem Modell nicht beobachtet werden (Abb. 5-12). Das Tumormodell mit sehr schnell wachsenden MC38-Tumorzelllinien ist aber eventuell nicht geeignet, um eine mögliche therapeutische Anwendung im Menschen zu untersuchen. Es wäre denkbar, den durch eine therapeutische pCI-MUC1 oder pCI-CEA Vakzinierung induzierten Schutz nach einer chirurgischen Entfernung der Tumore in Mäusen zu untersuchen.

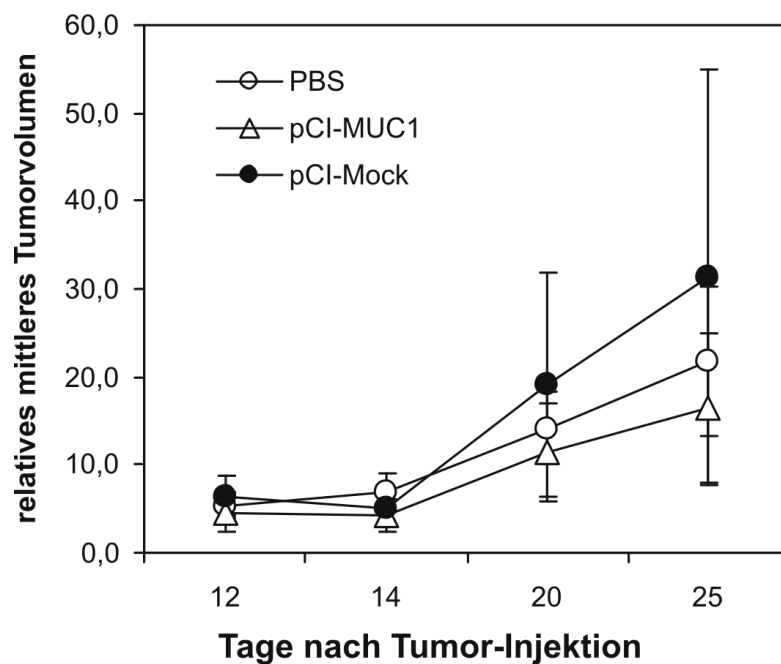


Abbildung 5-12: Ergebnisse der *in vivo* Versuche zum Einsatz der pCI-MUC1 Vektoren als therapeutische Tumorstadien im MC38-MUC1 / C57BL/6-Modell. Dargestellt ist das relative mittlere Tumorstadium der verschiedenen Gruppen (bezogen auf das Tumorstadium der ersten Messung, N=6 Tiere pro Gruppe).

5.3.5 Induktion von Tumormunität durch Vakzinierung mit MVA-MUC1 infizierten dendritischen Zellen

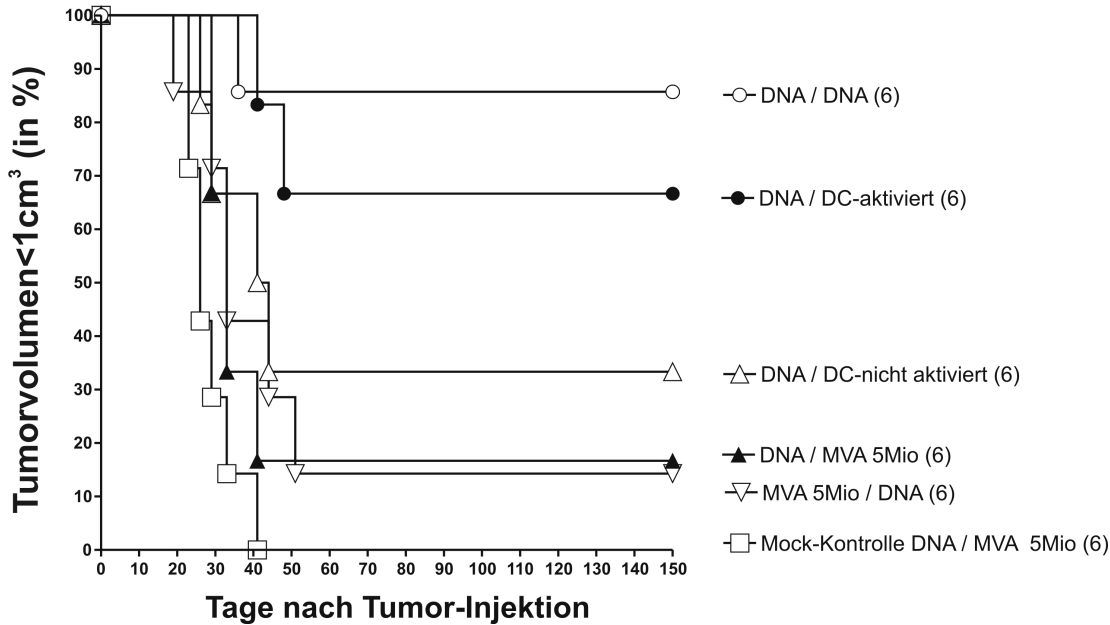


Abbildung 5-13: Ergebnisse der *in vivo* Versuche zum Einsatz von MVA-MUC1 infizierten dendritischen Zellen (*boosting*) in Kombination mit DNA (*priming*). Die Tiere erhielten DNA und 70000 MVA infizierte, CD40L stimulierte oder unstimulierte dendritische Zellen (N=6 Tiere pro Gruppe). Die anderen Gruppen sind in Abb. 5-9 beschrieben.

Abb. 5-13 zeigt die Ergebnisse der Vakzinierung von Mäusen mit pCI-MUC1 (*priming*) und 70 000 MVA-MUC1 bei einer MOI von 3 infizierten dendritischen Zellen (*boosting*, die Zellzahl bezieht sich auf den zum Zeitpunkt der Vakzinierung noch lebenden Anteil der DC) im Vergleich zu den Ergebnissen der DNA und MVA-Vakzinen. Die mit (durch CD40Ligand) aktivierten dendritischen Zellen vakzinierte Gruppe zeigt ein im Vergleich zur DNA/MVA-mock-Gruppe signifikant reduziertes Tumorwachstum ($p=0,0287$), nicht jedoch die mit nicht-aktivierten dendritischen Zellen vakzinierte Gruppe ($p=0,482$). Der Anteil der langfristig geschützten Tiere ist in beiden Gruppen geringer, als bei ausschließlich mit DNA vakzinierten Tieren. Alle Daten stammen aus einem Maus-Experiment. Über die Spezifität der Immunität kann keine Aussage gemacht werden, da keine Kontrolle mit MVA-mock infizierten dendritischen Zellen vorhanden ist. In einem zweiten Experiment (Abb. 5-14 und 5-15) erhielten die Tiere zweimal (*priming* UND *boosting*) eine höhere Dosis aktivierte oder nicht aktivierte MVA-MUC1-infizierte dendritische Zellen. Die Kontrolltiere erhielten gleiche Mengen MVA-mock-infizierte, aktivierte dendritische Zellen (DC-MVA-mock).

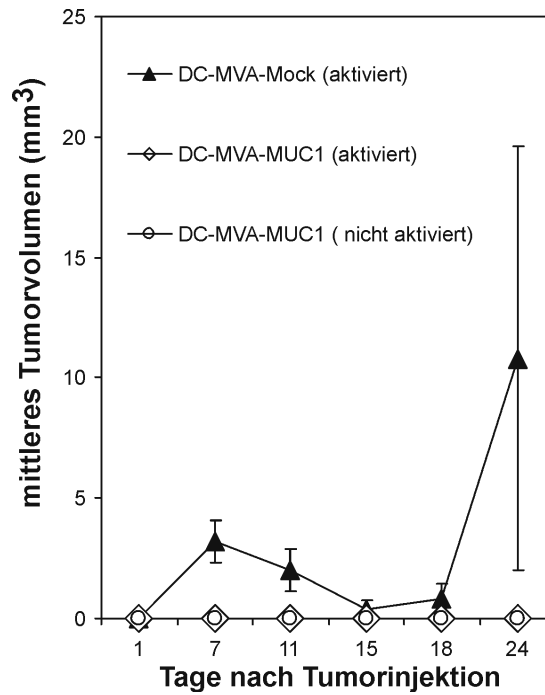


Abbildung 5-14: Ergebnisse der *in vivo* Versuche zum Einsatz von MVA-MUC1-infizierten dendritischen Zellen als prophylaktische Tumorumvakzine im MC38-MUC1 / C57BL/6 Tumor Modell. Im Gegensatz zum in Abb. 5-13 dargestellten Versuch wurden 0,5 Mio. dendritische Zellen (CD40Ligand aktivierte oder nicht aktivierte Zellen) zum *priming* und *boosting* eingesetzt. In den beiden mit MVA-MUC1 infizierten dendritischen Zellen vakzinierten Gruppe (5 bis 6 Tiere pro Gruppe) entsteht bei keiner Maus ein meßbarer Tumor. Bei der mock-Kontrollgruppe sind sehr kleine Tumore meßbar, die allerdings bei 4 von 5 Tieren eine vollständige Regression nach 15 Tagen zeigen. Der Anstieg des mittleren Tumorumfugens nach 18 Tagen beruht auf dem normal wachsenden Tumor in einem Tier.

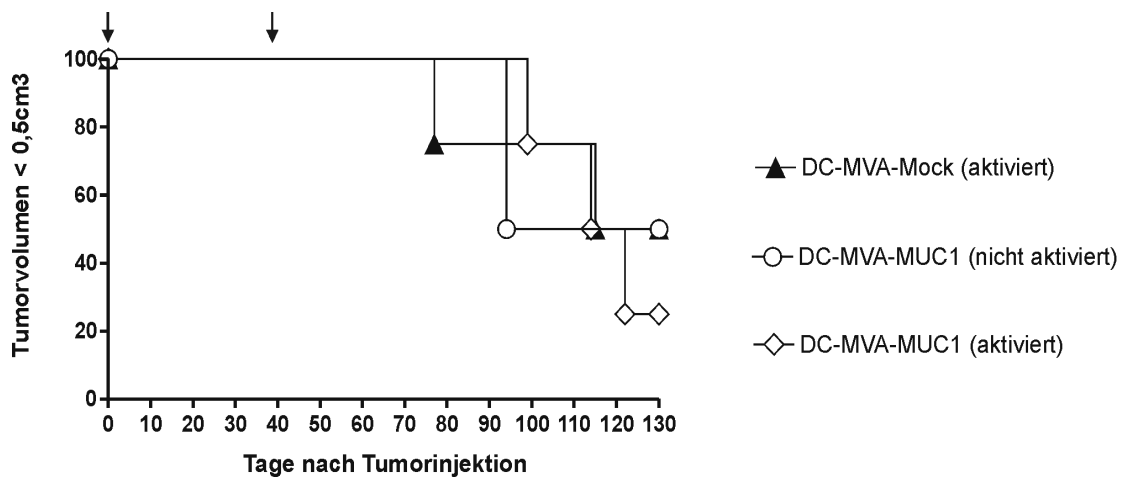


Abbildung 5-15: Wachstum von MC38 Tumoren in den in Abb. 5-14 beschriebenen Tieren nach erneuter Tumoringjektion an Tag 40 (Pfeil). Eine Injektion von 10^6 MC38-MUC1 Zellen führt zu vergleichbarem Tumorumwachstum in allen Gruppen (N=4 Tiere pro Gruppe).

Diese Vakzine führte auch in der mock-Kontrollgruppe zu einem fast vollständigen Schutz. Die Mäuse in der Kontrollgruppe entwickelten kleine Tumore (2x2mm). Meßbare MC38-MUC1 Tumore dieser Größe wuchsen in allen vorherigen Experimenten an, in den mit DC-MVA-mock vakzinierten Mäusen wurde aber bei 4 von 5 Mäusen bis Tag 14 eine vollständige Regression beobachtet. In einem Tier wuchs der Tumor weiter, was zum Anstieg der Kurve in Abb. 5-14 führt. Bei der experimentellen Gruppe wurden zu keinem Zeitpunkt meßbare Tumore beobachtet. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis auf eine durch MVA-MUC1 infizierte Zellen induzierte antigenspezifische Immunreaktion. Die durch die Verabreichung MVA-infizierter dendritischer Zellen induzierte, starke unspezifische Immunität erschwert jedoch die Auswertung der Wirksamkeit von MVA-infizierten DC im MC38 / C57BL/6-Tumormodell.

Jeweils 4 Tiere aus jeder Gruppe erhielten eine erneute Injektion von Tumorzellen an Tag 40. In allen Gruppen entwickeln jetzt 50 bis 75% aller Tiere einen Tumor (Abb. 5-15). Unterschiede zwischen den experimentellen und der Kontrollgruppe sind nicht erkennbar. Aufgrund der starken Induktion unspezifischer Immunität kann aus den durchgeführten Experimenten nicht ermittelt werden, ob die Vakzinierung mit Vakzinen auf der Basis MVA-infizierter dendritischer Zellen wirksamer ist, als die direkte Applikation der MVA-Vakzine. Die Ergebnisse zeigen, daß die Untersuchung von Vakzinen auf der Basis von *in vitro* generierten DC im MC38 / C57BL/6 Tumormodell aufgrund der induzierten unspezifischen Immunität sehr problematisch ist. Auf die Ursache und mögliche Umgehung dieser Problematik wird in der Diskussion eingegangen. Die Daten liefern einen Hinweis auf eine Antigen-spezifische Immunität (Abb. 5-14), die allerdings nicht - wie z.B. bei der reinen DNA-Vakzine - einen im Vergleich zur mock-Kontrollgruppe wirksameren Schutz darstellt (Abb. 5-15).

5.3.6 Ergänzende Experimente zum Einsatz von CD40Ligand-aktivierten APC zur Tumorummuntherapie

P388 ist ein B-Zell-Lymphom, welches durch *in vivo* Passagierung in syngenem DBA/2 Mäusen kultiviert wird (Fichtner et al., 1994) und 10 Tage nach der intraperitonealen Tumordinjektion (10^6 Zellen) zu einer letalen Aszites führt. Wie dendritische Zellen gehören auch B-Zellen zu den professionellen APC, exprimieren MHC-II und CD40, und können ebenfalls nach CD40Ligand-Stimulierung die Expression kostimulatorischer Moleküle hochregulieren. Im Falle des P388-B-Zell-Lymphoms konnte beobachtet werden, daß durch eine Kokultur mit CD40Ligand exprimierenden Zellen die Expression von MHC-II und CD80 stark hochreguliert wird (Abb. 5-16). Dieser Effekt wird durch Zugabe von anti-

CD40Ligand Antikörpern während der Kokultur blockiert. Die Stimulierung wurde wie in Kap. 4.13.3 beschrieben, durchgeführt, allerdings über einen Zeitraum von 72h. Die Expression von CD86 wird durch die Aktivierung nicht beeinflusst während die Expression von CD40 auf der Zelloberfläche durch die Bindung des Liganden abnimmt. Die Expression von MHC-II und kostimulatorischer Moleküle ist die Voraussetzung für die Induktion einer Immunantwort, so daß die Wirksamkeit von *in vitro* stimulierten P388 Zellen in syngenen DBA/2 Mäusen als prophylaktische Vakzine gegen P388 Lymphome getestet wurde. In B-Zell Lymphomen ist, wie in der Einleitung erwähnt, das für eine Tumormunität verantwortliche Antigen oft der Idiotyp des von der Zelle produzierten Immunglobulins. Aus Abb. 5-16 geht hervor, daß CD40Ligand aktivierte P388 Zellen in Mäusen ein normales Wachstum zeigen und innerhalb von 10 Tagen zu einem letalen Tumor führen. Eine zweimalige Impfung mit bestrahlten CD40Ligand stimulierten Zellen verhindert das Wachstum dieser aktivierten Zellen und schützt die Mäuse danach auch vor *in vivo* passagierten (transplantierten) P388 Tumorzellen. Dieser Effekt ist auf die CD40Ligand Aktivierung zurückzuführen, da eine Vakzinierung mit bestrahlten, unter gleichen Bedingungen kultivierten, aber nicht CD40Ligand-aktivierten P388 Zellen keine Immunität bewirkt.

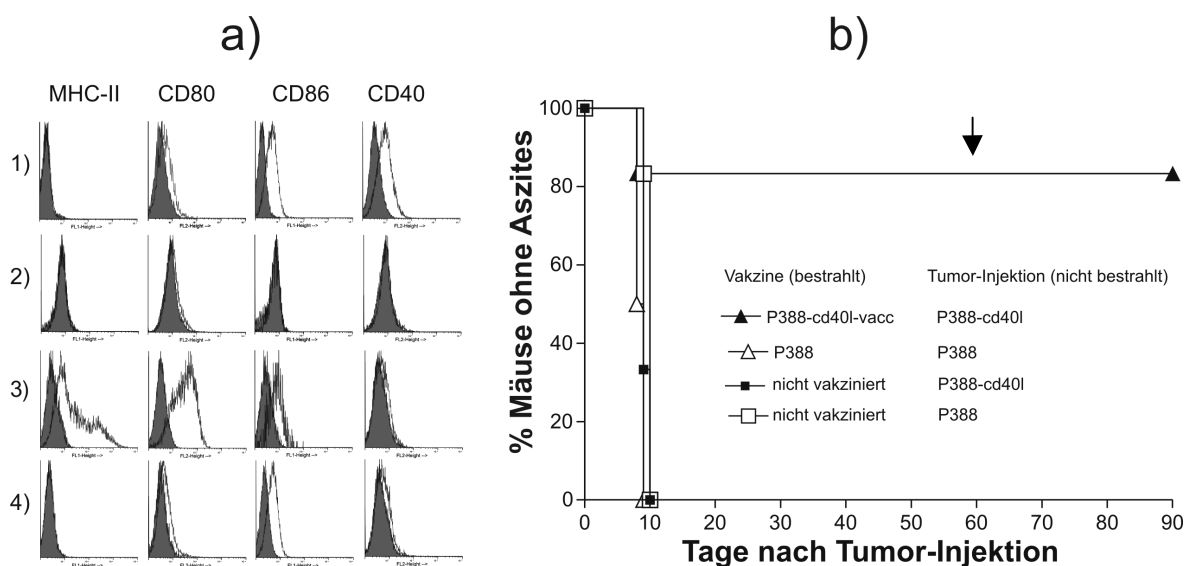


Abbildung 5-16: *In vitro* Aktivierung von P388 B-Zell-Lymphomzellen durch CD40Ligand und *in vivo* Versuch zum Einsatz aktivierter P388 Zellen als Tumorstoff. a) Durchflußzytometrische Analyse von 1) nicht stimulierten P388 Zellen, 2) den zur Stimulation verwendeten J558-CD40Ligand Zellen, 3) CD40Ligand aktivierten P388 Zellen, 4) in Gegenwart von die Signaltransduktion blockierenden Anti-CD40Ligand Antikörper mit J558-CD40Ligand aktivierte P388 Zellen. b) Analyse des Tumorstoffs (Aszites) von aktiviertem und nicht aktiviertem P388 Tumor in nicht vakzinieren und vakzinieren Mäusen. Die geimpften Tiere erhielten bestrahlte, aktivierte bzw. nicht aktivierte P388 Zellen als Vakzine. Nach 60 Tagen wächst auch ein transplantiertes Tumor in den geschützten Tieren nicht an (Pfeil).

5.4 *In vivo* Vergleich der DNA- und MVA-Vakzinen im MCA205-beta-Gal - C57BL/6 Modell

Ein Teil der unter 5.3 aufgeführten Experimente wurde parallel unter Verwendung des MCA205-beta-Gal Tumormodells durchgeführt, um die Wirksamkeit von MVA oder DNA Vakzinen gegen Tumore, die beta-Galactosidase exprimieren, zu ermitteln. MCA205 ist eine durch Methylcholanthren in C57BL/6 Mäusen induzierte Fibrosarkom-Zelllinie. Durch retroviralen Gentransfer wurde die beta-Galactosidase exprimierende Zelllinie MCA205-beta-Gal entwickelt. (Cayeux et al., 1999, Aicher et al., 1997). Beta-Galactosidase besitzt im Gegensatz zu Muzin keine repetitiven Sequenzen so daß die komplette cDNA im MVA Genom erhalten bleibt. Auch das Problem der extrem starken Glykosylierung von Muzin spielt bei beta-Galactosidase als bakterielles Antigen keine Rolle. Während der Effekt der Glykosylierung eines Antigens für die humorale Antwort gegen Muzin und andere Antigen in zahlreichen Studien dokumentierte ist (Karsten et al., 1998), ist bis heute weitestgehend unbekannt, ob der Grad der Glykosylierung eines Antigens die Interaktion von T-Zell-Rezeptoren mit auf MHC-Molekülen präsentierten Oligopeptiden entscheidend beeinflusst.

Ein weiterer Vorteil in diesem Modell ist der vergleichsweise einfache Nachweis von beta-Gal-spezifischen zytotoxischen T-Zellen. Der Nachweis von Muzin-spezifischen T-Zellen ist aus in Kap. 5.5.2 und in der Diskussion genannten Gründen in C57BL/6 Mäusen problematisch, die Demonstration der Spezifität der Immunantwort ist jedoch bei der Entwicklung von Vakzinen der – neben der *in vivo* Wirksamkeit - einer der wichtigsten Aspekte.

MCA205-beta-Gal ist eine *in vivo* langsam wachsende und sehr immunogene Tumor-Zelllinie. Auch nicht geimpfte Mäuse zeigen nach Injektion von 0,5 Millionen Zellen mitunter spontane Immunität, entwickeln keinen Tumor oder zeigen eine spontane Regression kleiner Tumore. Eine Erhöhung der Tumordosis (1 oder 1,5 Millionen Zellen) konnte diesen Effekt nicht verhindern. Die Tumorregression wurde nicht mehr beobachtet bei Mäusen, die nach 19 Tagen einen Tumor von mindestens 2x2mm hatten.

Abb. 5-17 zeigt, daß 75% aller nicht geimpften Mäuse einen Tumor entwickelten. Der Anteil sinkt auf 22% in der Gruppe, die zwei intramuskuläre Injektionen von pCI-LacZ erhielt, und stieg auf 100% in Gruppen von Mäusen die entweder pCI-LacZ (*priming*) und MVA-LacZ (*boosting*), oder pCI-mock und MVA-mock oder erhielten. In der ausschließlich mit pCI-mock vakzinierten Gruppe entwickeln 57% aller Tiere einen Tumor.

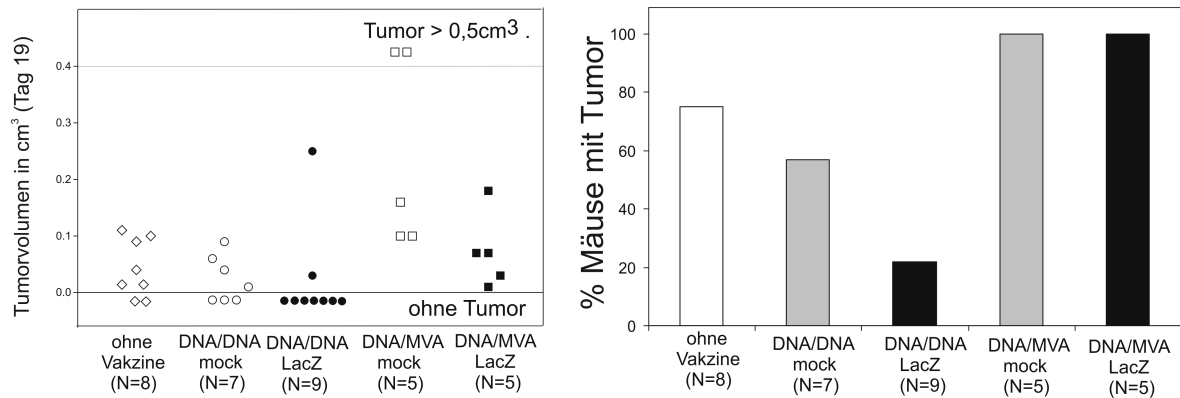


Abbildung 5-17: Ergebnisse der *in vivo* Versuche zum Einsatz von pCI-LacZ als prophylaktische Tumorstoffvakzine im MCA205-beta-Gal / C57BL/6-Modell. Die linke Abbildung zeigt die Tumorstoffvolumina der einzelnen Mäuse. Die rechte Abbildung zeigt den Prozentsatz der Mäuse einer Gruppe, die einen Tumor ausbildeten. Aus jeder Gruppe wurden 5 Mäuse an Tag 19 für die Bestimmung der T-Zell-Antwort geopfert.

5.5 Analyse der zellulären und humoralen Immunantwort

Aus den in der Einleitung erwähnten Gründen ist derzeit die Suche nach einem immunologischen Faktor, der mit der *in vivo* Wirksamkeit einer Tumorstoffvakzine korreliert, einer der wichtigsten Aspekte bei der Weiterentwicklung von klinisch anwendbaren Immuntherapien.

5.5.1 Analyse der humoralen Antwort gegen Muzin und Vakzinia-Epitope

Die humorale Antwort gegen Muzin ist sowohl bei DNA als auch MVA vakzinierten Tieren gering im Vergleich zu Tieren die mit Adenovirus-MUC1 geimpft wurden (Abb. 5-18a). Lediglich das *priming* mit DNA und *boosting* mit MVA führt zur Induktion von signifikanten Mengen Muzin-spezifischer Antikörper im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe. Die Injektion von MC38-MUC1 führt dazu, daß auch in der negativen Kontrollgruppe (PBS) Muzin-spezifische Antikörper detektierbar sind (Abb. 5-18a). Die reine DNA-Vakzinierung induziert nur geringe Mengen Muzin-spezifischer Antikörper, diese lassen sich jedoch eindeutig in Tieren nachweisen, die keinen Muzin-exprimierenden Tumor erhalten haben (Abb. 5-18b). Gegen virale Epitope gerichtete Antikörper lassen sich in den mit MVA-mock (WT) oder MVA-beta-Gal Virus vakzinierten Mäusen durch ELISA nachweisen. Da kein synthetisches oder rekombinantes Vakzinia-Antigen vorhanden war, wurde der ELISA unter Verwendung von mit inaktivierten Viruspartikeln (MVA-WT) beschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt (Abb. 5-18c).

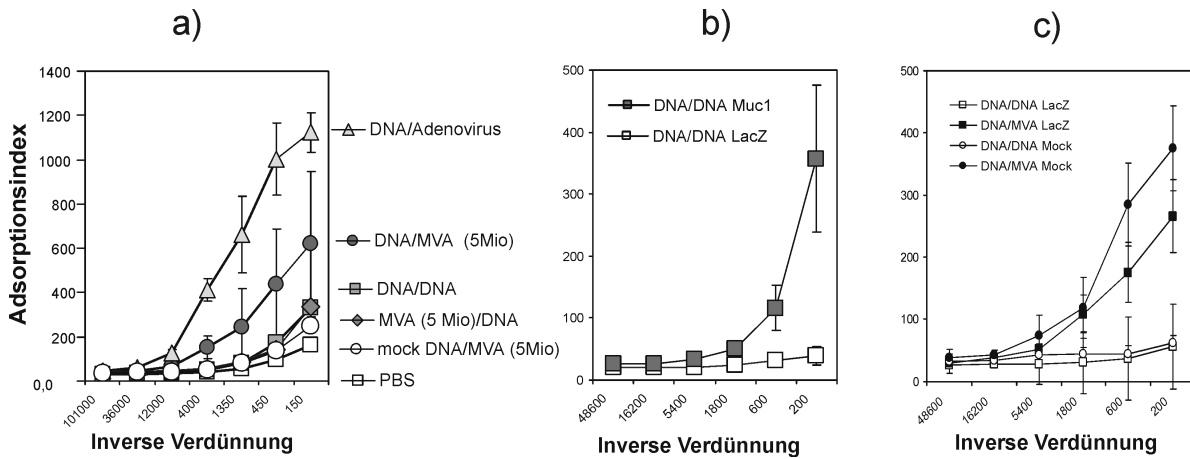


Abbildung 5-18: ELISA-Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Muzin (a und b) und Vakzina Epitope (b) in Seren von mit DNA und MVA-Vektoren vakzinierten Mäusen 19 Tage nach der Tumorerjektion. Die Mäuse erhielten die angegebenen Vakzinen und eine Injektion von MC38-MUC1-Tumorzellen (a, vergleiche Abb. 5-9) oder MCA205-beta-Gal-Tumorzellen (b, c, vergleiche Abb. 5-17). Dargestellt ist der Mittelwert aus 6 Tieren pro Gruppe. Zum Vergleich sind Seren von 6 mit Adenovirus-MUC1 vakzinierte Tiere analysiert worden. Die dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert von 5 bis 6 Tieren pro Gruppe.

5.5.2 Nachweis Muzin-spezifischer CTL durch den Chrom-Freisetzungstest

An Tag 21 nach der Tumorerjektion isolierte Milzzellen von durch pCI-MUC1-Vakzinierung vor MC38-MUC1 Tumoren geschützten Tieren sind in einem Standard-4h-Chrom-Freisetzungstest nicht in der Lage, MC38-MUC1 oder MC38 Tumorzellen zu lysieren (Abb. 5-19). Lediglich Milzzellen der mit MVA-infizierten dendritischen Zellen vakzinierte Tiere lysieren MC38-Zellen, jedoch unabhängig von der Muzin-Expression. Dieses Ergebnis erklärt die in dem in Abb. 5-14 dargestellten Experiment beobachtete, starke unspezifische Immunität.

Nach 5-tägiger Restimulierung in der Gegenwart von synthetischem MUC1 Antigen (MUC1-*tandem-repeat*-60mer) werden ca. 50% der MC38-MUC1-Zielzellen lysiert, die Lysis ist allerdings nicht Muzin-spezifisch: Muzin-negative MC38 Zellen (MC38-WT) werden in annähernd gleichem Ausmaß lysiert (Abb. 5-20). Die Stimulierung mit synthetischem MUC1-*tandem-repeat*-Peptid ist keine geeignete Methode um selektiv Muzin-spezifische zytotoxische T-Zellen aus vakzinierten C57BL/6 Mäusen zu expandieren. Die Analyse von 2 Mäusen jeder Gruppe lieferte ähnliche Ergebnisse.

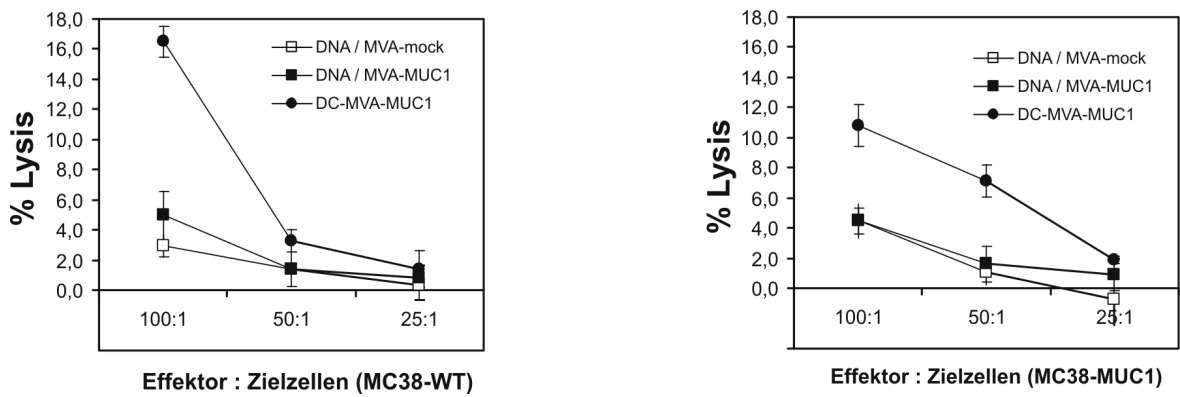


Abbildung 5-19: Ergebnisse eines Standard-Chrom-Freisetzungstests mit Milzzellen von Tieren, die mit MVA-MUC1, MVA-mock oder MVA-infizierten dendritischen Zellen vakzinieren wurden (vergl. Abb. 5-13). Die Tiere wurden 7 Tage nach der letzten Vakzinierung getötet. Die Abbildung zeigt die prozentuale Lysis von Mucin-exprimierenden (rechts) und Mucin-negativen MC38 Zellen (links) ohne *in vitro* Restimulation von CTL.

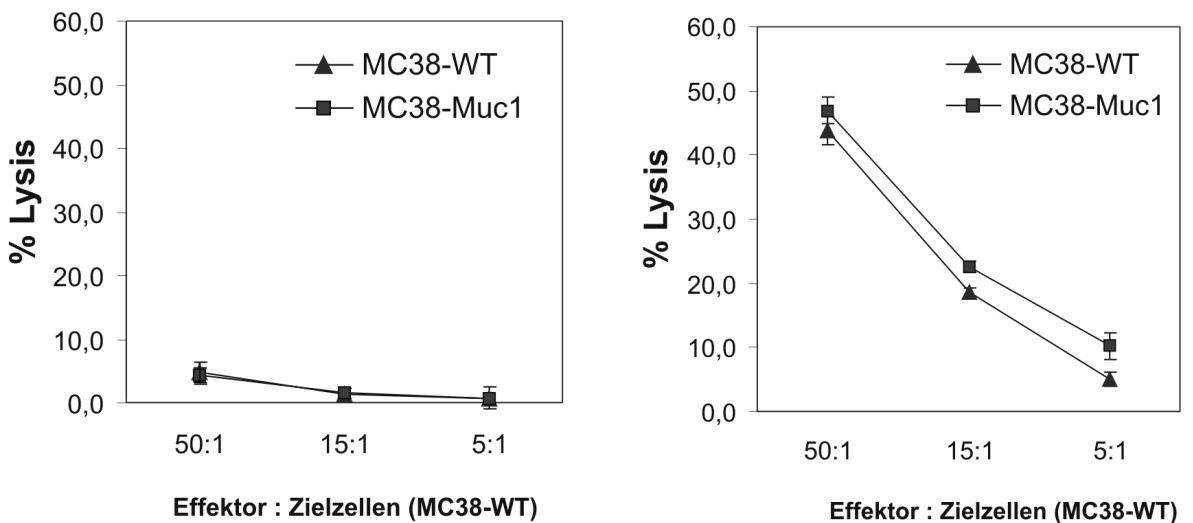


Abbildung 5-20: Chrom-Freisetzungstest zur Detektion von Mucin-spezifischen CTL in Milzzellen pCI-DNA-vakzinierter Mäuse vor (links) und nach (rechts) 5-tägiger *in vitro* Restimulation. Die Restimulation der 7 Tage nach der letzten Vakzinierung präparierten Milzzellen erfolgte wie im Methodenteil angegeben mit IL2 und VNTR-60mer MUC1.

5.5.3 Nachweis der zellulären Antwort durch intrazelluläre IFN-gamma-Färbung

Der Nachweis von beta-Gal und Muzin-spezifischen CTL durch intrazelluläre INF-gamma-Färbung:

Um die Häufigkeit von beta-Galactosidase spezifischen CTL zu bestimmen wurden nach 6-stündiger Restimulierung mit dem K^b-immundominanten beta-Gal Peptid ICPMYARV 500 000 CD3 positive Zellen mittels Durchflußzytometrie analysiert. Der Prozentsatz an beta-Gal-spezifischen CTL wurde in den individuellen Tieren durch Bestimmung des Anteils an Zellen, die sowohl durch anti-CD8-PE, als auch durch anti-IFN-gamma-FITC färbbar sind, ermittelt. Das Fenster wurde dabei so gewählt, daß bei den Tieren aus den Kontrollgruppen nicht mehr als 0,0 bis 0,02 aller CD8 positiven Zellen in diesem Bereich liegen (Hintergrund). CTL Frequenzen, die höher sind als der Mittelwert der Kontrolltiere zuzüglich der dreifachen Standardabweichung (in der Regel 0,03 bis 0,04% aller CD8 Zellen) werden als signifikant bezeichnet.

In dem in Abb. 5-21 und 5-22a dargestellten Experiment ließen sich in allen mit pCI-LacZ vakzinierten Mäusen beta-Gal spezifische CTL nachweisen, die Menge an spezifischen CTL in MVA vakzinierten Tieren ist jedoch nur in einer von 5 Mäusen signifikant. Im Durchschnitt erkennen 19 Tage nach der letzten Vakzinierung 580 von 10⁵ CD8+CD3+ Zellen das immundominante beta-Gal Epitop (0,06%). In zwei weiteren Experimenten konnte bestätigt werden, daß die pCI-beta-Gal Vakzinierung unabhängig von der Injektion beta-Gal positiver Tumore eine CTL-Antwort gegen beta-Galactosidase induziert. Die hohe CTL-Frequenz gegen beta-Galactosidase in einem mit mock-DNA vakzinierten Tier (Abb. 5-22b) ist möglicherweise durch die Injektion beta-Gal positiver Tumorzellen induziert worden - ebenso wie bereits erwähnte Induktion niedriger, aber meßbarer Titer von Muzin-spezifischen Antikörpern durch die Injektion von MC38-MUC1-Tumorzellen.

Für den Nachweis Muzin-spezifischer zytotoxischer T-Zellen standen lediglich 60- und 120-mere synthetische Peptide der *variable number tandem repeat* (VNTR) Region des Muzin Moleküls zur Verfügung. Diese Peptide sind nicht geeignet um Muzin-spezifische T-Zellen aus Milzzellen von vakzinierten C57BL/6 Mäusen für Zytotoxizitätstests zu expandieren. Auch mit Hilfe der IFN-gamma-Färbung lassen sich durch Restimulierung mit MUC1-VNTR-Peptiden keine Muzin-spezifischen T-Zellen nachweisen (siehe Abb. 5-23).

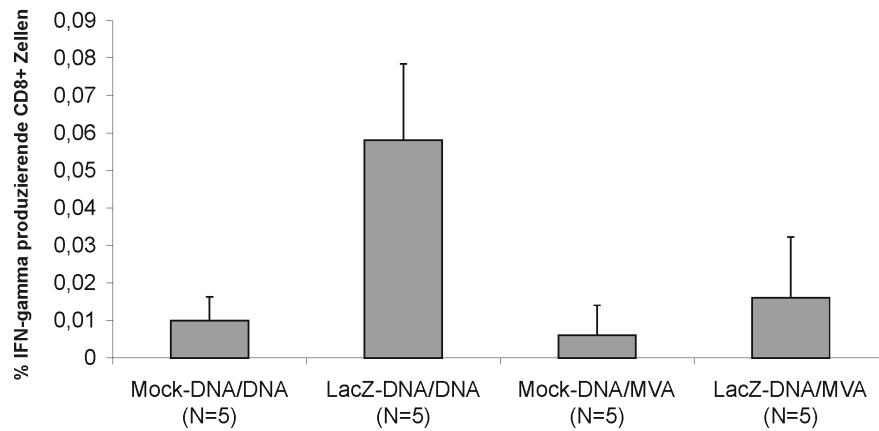


Abbildung 5-21: Ergebnisse des Nachweises von beta-Gal spezifischen zytotoxischen T-Zellen in mit pCI-LacZ und MVA-LacZ vakzinieren Mäusen des MCA205-beta-Gal / C57BL/6 Tumormodells (siehe Abb. 5-17) 19 Tage nach der Tumorinjektion. Die spezifischen CTL-Frequenzen der individuellen Tiere sind in Abb. 5-22a dargestellt.

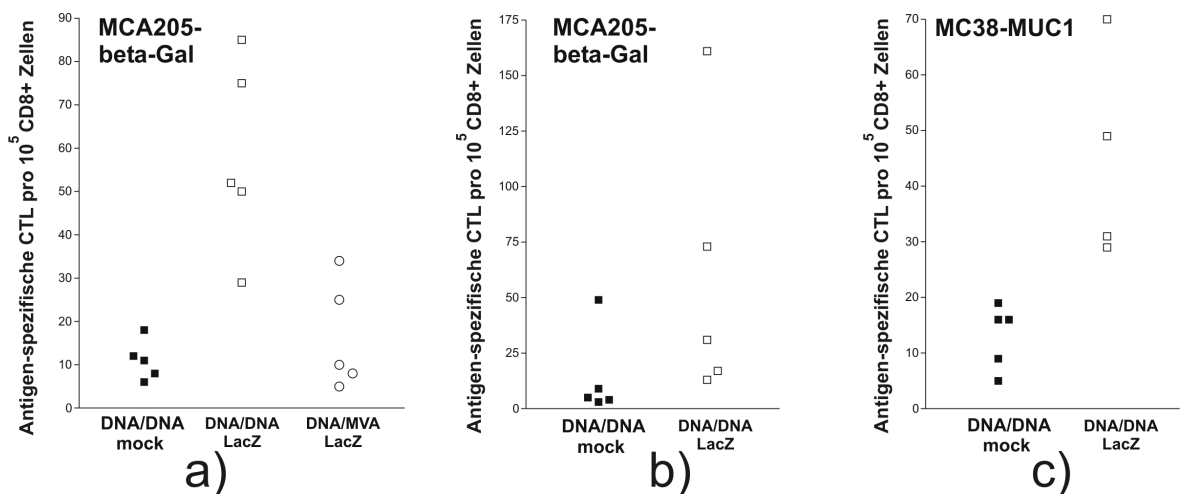


Abbildung 5-22: Die Anzahl der aufgrund der Stimulation mit dem beta-Galactosidase Peptid ICPMYARV IFN-gamma sezernierenden CTL pro 100 000 CD3+CD8+ Zellen in drei unabhängigen Experimenten (a bis c) am Tag 19 bis 23 nach der letzten Vakzinierung. Die Tiere erhielten die angegebenen DNA bzw. MVA-Vakzinen und eine Injektion von MCA205-beta-Gal Tumorzellen oder MC38-MUC1-Tumorzellen.

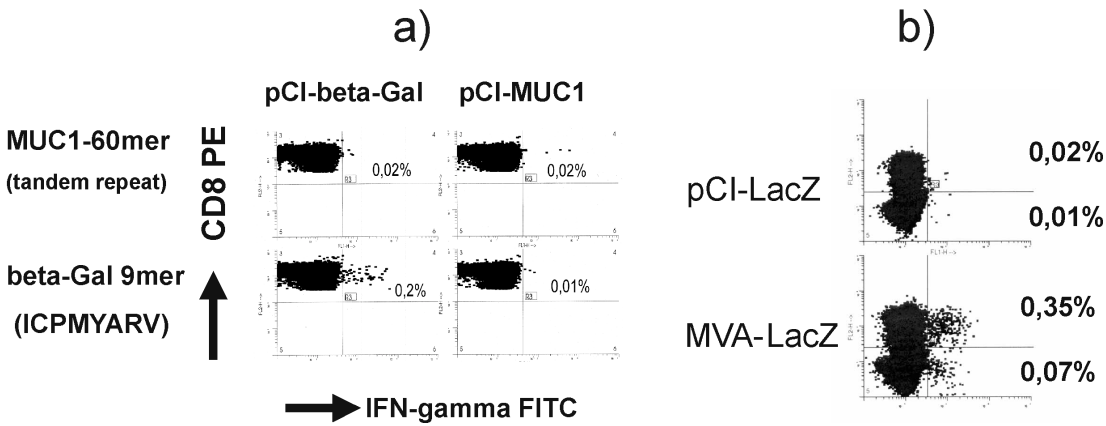


Abbildung 5-23: Beispiel des Nachweises antigenspezifischer CTL durch intrazelluläre IFN-gamma Färbung. a) Nachweis von beta-Gal spezifischen CD8+ T-Zellen in Milzzellen DNA-vakzinierter Mäuse. Durch Restimulierung mit dem immundominanten beta-Gal Peptid lassen sich beta-Galactosidase-spezifische T-Zellen quantitativ nachweisen. Der Nachweis von Muzin-spezifischen T-Zellen durch Stimulierung mit *variable number tandem repeat* 60mer ist nicht möglich. b) Nachweis von gegen Vakzinia Epitope gerichtete T-Zellen: Durch Restimulierung von Milzzellen von mit pCI-LacZ oder MVA-LacZ vakzinieren Tieren mit MVA-infizierten dendritischen Zellen lassen sich gegen Vakzinia Epitope gerichtete zytotoxische (CD8+) und Helfer-T-Zellen (CD8-) nachweisen. Da nur CD3+-Zellen bei der FACS-Analyse eingelesen werden, entspricht die CD8-negative Population der T-Helferzellen-Population.

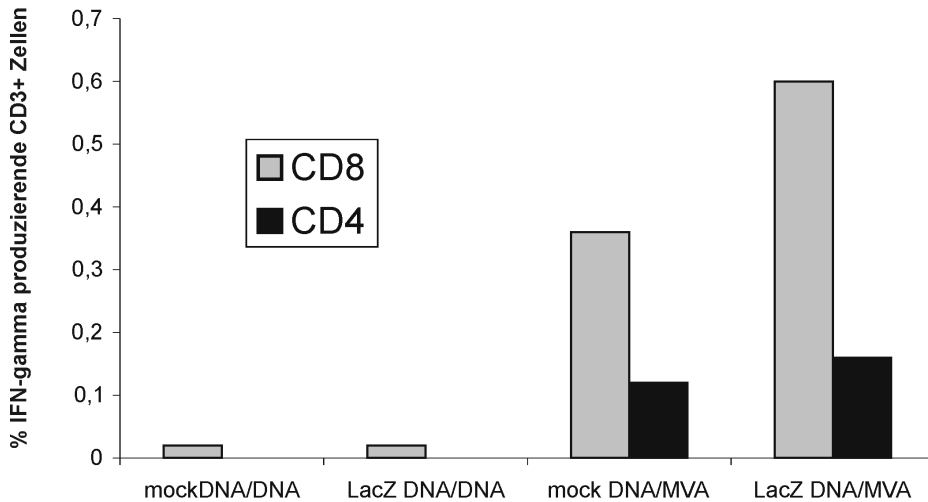


Abbildung 5-24: Nachweis von CTL und T-Helferzellen gegen Vakzinia Epitope in vakzinieren Mäusen aus dem MCA205-beta-Gal / C57BL/6-Modell (gepoolte Milzzellen von 5 Mäusen pro Gruppe, vergleiche Abb. 5-17) durch Restimulierung mit MVA infizierten dendritischen Zellen. Die Art der Vakzine ist unter der X-Achse angegeben.

Der Nachweis von Vakzinia-spezifischen CTL durch zelluläre Stimulierung:

Sowohl zytotoxische T-Zellen als auch T-Helferzellen lassen sich durch *in vitro* Restimulierung mit MVA-infizierten, syngenen dendritischen Zellen aufgrund der Produktion von IFN-gamma nachweisen (siehe Abb. 2-2). 0,36 bis 0,6% aller CD8+ Zellen und 0,12 bis 0,16% aller CD4+ Zellen erkennen virale Peptide, die auf den dendritischen Zellen präsentiert werden und reagieren mit IFN-gamma Synthese. Mit MVA-LacZ infizierte dendritische Zellen sind nicht in der Lage, beta-Gal spezifische T-Zellen in der mit pCI-LacZ vakzinierten Gruppe zu stimulieren. Die Präsentation von beta-Galactosidase-Epitopen auf MVA-LacZ infizierten dendritischen Zellen ist nicht ausreichend, um LacZ-spezifische T-Zellen *in vitro* zur Produktion von IFN-gamma anzuregen. (Abb. 5-23 und 5-24). Diese Vakzinia-spezifischen CTL und T-Helferzellen ließen sich – im Gegensatz zu durch pCI-Vakzinierung induzierten beta-Gal-spezifischen CTL - auch 60 Tage nach der Vakzinierung noch nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis von Tumorantigen-spezifischen CTL durch zelluläre Stimulierung:

Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Nachweis von LacZ oder Vakzinia-spezifischen CTL war die in Kap. 4.16.3.2 beschriebene 20-stündige Stimulierung mit Protein-gepulsten dendritischen Zellen wenig erfolgreich: Mit rekombinanter beta-Galactosidase oder Muzin-60mer gepulste dendritische Zellen induzierten in Milzzellen mehrerer individuell untersuchter DNA-vakzinierter Mäuse keine IFN-gamma Produktion (Daten nicht gezeigt). Die Restimulierung von pCI-LacZ vakzinierten Mäusen mit MCA-205-beta-Gal war weniger sensitiv im Vergleich zur Restimulierung mit dem Oligopeptid ICPMYARV (Abb. 5-25). Nur in der Maus mit der höchsten CTL-Frequenz reagieren 33 von 10^5 CD3+CD8+-T-Zellen mit der Produktion von IFN-gamma im Vergleich zu 161 von 10^5 bei einer Restimulierung der gleichen Milzzellen mit dem Oligopeptid. Der Versuch zeigt, daß - wahrscheinlich durch die wesentlich höhere Dichte an entstehenden Peptid-MHC Komplexen - die Stimulierung mit immundominanten Oligopeptiden ein deutlich sensitiverer Nachweis von CTL ist.

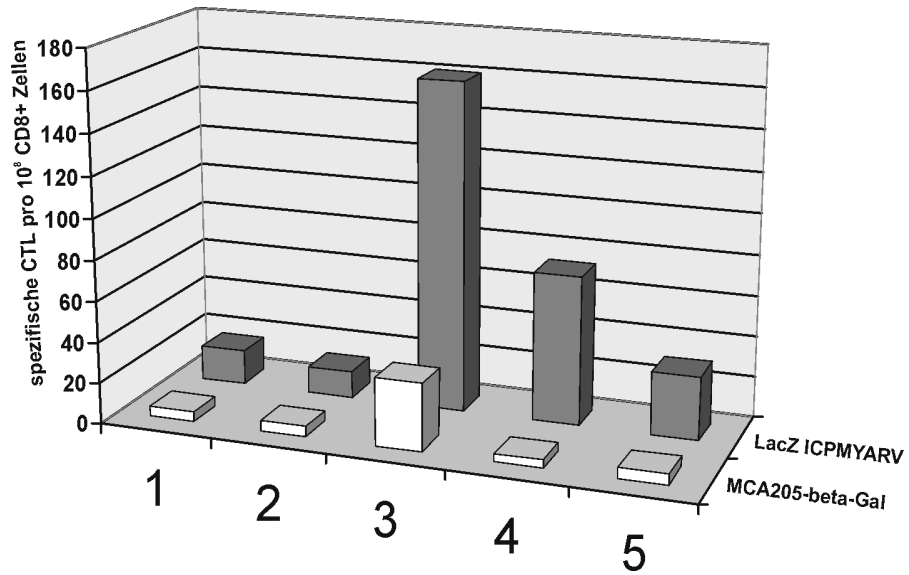


Abbildung 5-25: Die Abbildung zeigt die CTL-Frequenz (pro 10⁵ CD8+CD3+ T-Zellen) nach einer 6h-Restimulierung von Milzzellen der in Abb. 5-22b dargestellten Mäuse mit dem Peptid ICPMYARV im Vergleich zu einer 20h-Restimulierung mit MCA-205-beta-Gal .

6 Diskussion

Vergleich der Vakzinierungsprotokolle auf der Basis von DNA und MVA

Die auf dem Vektor pCI basierende DNA-Vakzine, nicht jedoch die MVA-Vakzine stellt in C57BL/6 Mäusen einen wirksamen Impfstoff für die prophylaktische Therapie von Tumoren, die humane Tumorantigene oder das bakterielle Antigen beta-Galactosidase exprimieren dar.

Die DNA-Vakzine induziert einen effektiven, antigenspezifischen und langfristigen Schutz vor MC38-MUC1-Tumorzellen, der nicht durch die Vakzinierung mit hohen (5×10^7) oder niedrigen (5×10^6) Dosen MVA erreicht wird (Abb. 5-9). Der Prozentsatz der durch pCI-MUC1 DNA-Vakzinierung tumorfreien Tiere in 4 unabhängigen Experimenten betrug 83 bis 86% im Vergleich zu 0% bis 16% in den PBS, mock-DNA, oder MC38-WT Kontrollgruppen (Abb. 5-9, 5-10). Die Wirksamkeit der pCI-MUC1-DNA Vakzine ist vergleichbar mit der Wirksamkeit einer adenoviralen Tumorstoffimpfung im gleichen Tumormodell (Abb. 5-9, Hagen Kulbe, MDC-Berlin und Humboldt-Universität Berlin, persönliche Kommunikation). Auch im C57BL/6 / MC38-CEA-Tumormodell wird durch die DNA Vakzine ein vergleichbarer Schutz vor CEA-exprimierenden Tumoren induziert (Abb. 5-11).

Der wirksamere Schutz der DNA-Vakzine konnte in einem zweiten Modell unter Verwendung des im Vergleich zu MC38-MUC1 immunogeneren Tumors MCA205-beta-Gal bestätigt werden: In nicht vakzinierten oder mit mock-DNA vakzinierten Tieren zeigen einige Tiere spontane Immunität (in beiden Gruppen insgesamt 5 von 15 Tieren). Dagegen entwickelten 100% aller mit MVA-mock oder MVA-beta-Gal vakzinierten Tiere (insgesamt 10) einen Tumor, und insbesondere bei der MVA-mock Kontrollgruppe ist ein stärkeres Tumorstoffwachstum zu beobachten (vergleiche Abb. 5-17). Das deutet darauf hin, daß die Injektion von 50 Millionen PFU MVA-mock sogar einen immuninhibitorischen Effekt haben könnte. Auch in diesem Modell wird durch die pCI-DNA-Vakzine ein effektiver Schutz vor Tumorstoffwachstum induziert.

Vergleich der DNA und MVA Vakzinen mit publizierten Tiermodellen und klinischen Studien zur Therapie Mucin exprimierender Tumore

In den letzten Jahren wurden bereits verschiedene Vektoren zur Immuntherapie Mucin positiver Tumore in Tiermodellen untersucht. Gong et al. konnten zeigen, daß Vakzinen

auf der Basis von mit Muzin-exprimierenden Adenoviren infizierten dendritischen Zellen 90% aller Mäuse über einen Zeitraum von 40 Tagen vor MC38-MUC1-Tumorwachstum schützen (Gong et al., 1997). Die Schutzwirkung durch Muzin-transgene replikationskompetente Vakzinia-Viren ist in den verschiedenen Studien unterschiedlich: In einer von Acres et al. beschriebenen Studie sind 30% aller DBA/2 Mäuse und 0% aller Balb/c Mäuse (hier wird nur ein verlangsamtes Tumorwachstum beobachtet) vor dem Wachstum syngener, Muzin-exprimierender Tumore (P815 bzw. 3T3-Tumorzellen) geschützt (Acres et al., 1993). Durch einen Chrom-Freisetzungstest konnten Vakzinia spezifische T-Zellen, nicht jedoch Muzin-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Akagi et al. erzielten einen 100%igen Schutz durch Muzin-exprimierende Vakzinia-Viren vor etablierten MC38-MUC1 Tumoren über einen Zeitraum von 60 Tagen. Dieses vielversprechende Ergebnis erforderte allerdings die Koinjektion von Vakzinia-Viren, die kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86) exprimieren (Akagi et al., 1997). Sehr effizient ist auch eine von Gong et al. entwickelte Vakzine, auf der Basis von mit MC38-MUC1 fusionierten dendritischen Zellen (Gong et al., 1997). Diese Vakzine ist in der Lage, die Toleranz gegen Muzin in MUC1-transgenen Mäusen zu durchbrechen und auch wirksam gegen bereits etablierte Tumore (Gong et al., 1998).

Die Anwendung von DNA Vakzinen zur Immuntherapie Muzin-exprimierender Tumore wurde bisher nur in einem Tiermodell untersucht (Graham et al, 1996): Die dreimalige Injektion von insgesamt 300µg des Plasmid Vektors pH β APr-I-neo-MUC1 schützte 78% aller Mäuse (des gleichen H-2^b-Haplotyps) im Vergleich zu 43% in der Kontrollgruppe (mock-DNA) vor Wachstum von RMA-MUC1 Tumorzellen über einen Zeitraum von 60 Tagen. Gründe für die signifikantere, durch nur zweimalige Injektion von insgesamt 100µg pCI-MUC1 induzierte Tumormunität in dieser Studie sind möglicherweise Eigenschaften des verwendeten Vektors, die eine starke und stabile Expression des Transgens in Säugerzellen gewährleisten sollen (siehe Kap. 2.4), beispielsweise die Expression unter Kontrolle des CMV-Promotors im Vergleich zu dem von Graham et al. verwendeten beta-Actin Promotor. Aber auch Unterschiede im verwendeten Tumormodell können für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein.

Die Anwendung von MVA zur Immuntherapie Muzin-exprimierender Tumore ist bisher nicht untersucht worden. In einigen Studien wurden bereits optimale Protokolle zur Induktion von Immunität gegen Antigene verschiedener Pathogene (Malaria, Influenza, HIV) im Mausmodell durch Immuntherapie mit rekombinanten MVA-Viren entwickelt. Es konnte gezeigt werden, daß die intravenöse, intramuskuläre, intradermale oder intraperitoneale Injektion von niedrigen Dosen (10⁶ PFU) oder hohen Dosen (10⁷ PFU) MVA zelluläre und humorale Immunität induzieren kann. Vor allem in Kombination mit

DNA-*priming* und bei intravenöser Verabreichung wurde eine starke Immunreaktion beobachtet (Degano et al., 1999, Gilbert et al., 1999, Hanke and McMichael, 1999, Schneider et al., 1998). Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für die in dieser Studie verwendeten Vakzinierungsprotokolle auf der Basis einer kombinierten DNA/MVA Vakzine zur Immuntherapie von Muzin-exprimierenden Tumoren. Aufgrund der Beobachtung, daß replikationskompetente Vakzinia Viren nur bei der zusätzlichen Induktion starker kostimulatorischer Signale eine starke Muzin-spezifische Immunantwort auslösen (Akagi et al., 1997), wurde parallel die Anwendung MVA infizierter dendritischer Zellen als Tumorstoffvakzine untersucht. Die Herstellung von Vakzinen auf der Basis von syngenen dendritischen Zellen ist erheblich aufwendiger als die direkte Verabreichung von Plasmid oder viralen Vektoren, derartige Vakzinen sind jedoch in Tiermodellen wirksam zur Induktion von Immunität gegen Selbst-Antigene und zur Therapie bereits etablierter Tumore eingesetzt worden.

Zusammenfassend läßt sich aus den durchgeführten Experimenten schließen, daß in C57BL/6 Mäusen die pCI-DNA-Vakzine, nicht aber die MVA-Vakzine einen wirksamen Schutz vor Tumoren, die Fremd-Antigene exprimieren, induziert und eine Verbesserung der publizierten Vakzinen zur Therapie Muzin-exprimierender Tumore auf der Basis von DNA bzw. replikationskompetenten Vakzinia Viren darstellt.

Vor kurzem wurden Ergebnisse einer klinischen Studie (Phase I/II) zur immuntherapeutischen Anwendung von replikationskompetenten Vakzinia Viren in an Brustkrebs erkrankten Patienten publiziert (Scholl et al., 2000). Die verwendeten Vakzinia Viren exprimierten Muzin (unter Kontrolle des p7.5 Promotors) und IL2. Das Ziel von Studien dieser Art ist die Auswertung der Toxizität, sowie der immunologischen und klinischen Reaktion. Mehrere Injektionen von Vakzinia-MUC1-IL2 führten zu einer detektierbaren humoralen Antwort gegen Vakzinia Epitope, eine Erhöhung der Serum-Konzentration an Muzin-spezifischen Antikörper wurde in keinem der 9 Patienten beobachtet. Bei einem der 9 Patienten konnte durch die Stimulierung mit synthetischem Muzin-VNTR-Peptid und IL2 in einer gemischten Lymphozyten Kultur eine antigenspezifische Proliferation detektiert werden. Zur Detektion von CTL wurde eine extrem aufwendige, 2-wöchige Expansion von spezifischen T-Zellen durch Restimulierung mit autologen dendritischen Zellen, die mit Muzin-exprimierenden Adenoviren infiziert wurden, durchgeführt. Um syngene, Muzin-präsentierende Ziel-Zellen für einen Chrom-Freisetzungstest zu erhalten, wurden aus PBL jedes Patienten durch Epstein-Barr-Virus-Transformation Lymphoblasten-Zelllinien generiert und mit Vakzinia-MUC1 (bzw. Vakzinia-mock) infiziert. Dieser Test lieferte nur in einem Einzelfall einen Hinweis auf eine zytotoxische T-Zell Antwort gegen Muzin. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß MVA-beta-Gal oder MVA-MUC1-infizierte dendritische Zellen Vakzinia-spezifische CD4- und CD8-T-Zellen *in vitro* sehr gut

stimulieren können, nicht jedoch Muzin bzw. beta-Gal spezifische T-Zellen (Abb. 5-23 und 5-24). Dementsprechend sind Vakzinia-infizierte Zielzellen keine geeigneten Zielzellen für einen Chrom-Freisetzungstest unter Verwendung von Effektorzellen aus mit Vakzinia geimpften Tieren oder Menschen. Sämtliche Patienten in der Studie von Scholl et al. entwickelten eine fortschreitende Tumorerkrankung, und 8 von 9 Patienten sind innerhalb von 20 Monaten an der Erkrankung verstorben. Diese Studie demonstriert beispielhaft, daß von den erklärten Zielen der bisherigen klinischen Versuche zur Tumormimmuntherapie oft lediglich die Auswertung der Toxizität der verwendeten Vektoren erfüllt wird. Ohne geeignete Methoden, die sensitiv und eindeutig zelluläre Antworten in den individuellen Patienten nachweisen, ist der Informationsgewinn von Studien dieser Art - im Vergleich zu dem extremen Aufwand - gering. In dem durchgeführten MC38-MUC1 / C57BL/6 Modell konnte durch entsprechende Kontrollen auch ohne den Nachweis von Muzin-spezifischen T-Zellen der Nachweis erbracht werden, daß die Vakzine signifikante, schützende und antigenspezifische Immunität induziert. Das erfordert jedoch das exakte Einhalten einer Reihe von Parametern in den experimentellen und Kontrollgruppen, wie z.B. die Dosis, Wachstumsverhalten, Immunogenität und Lebensfähigkeit der injizierten Tumorzellen oder das Alter der verwendeten Mäuse. Durch fehlende Kontrollgruppen, der geringen Anzahl und unterschiedlichen Tumorerkrankungen der individuellen Patienten, bleibt die Analyse einer klinischen Studie ohne die Messung eines mit der Tumorregression korrelierenden immunologischen Faktors im Vergleich zu Tiermodellen sehr subjektiv. Die Generierung von syngenen Zielzellen für einen Chrom-Freisetzungstest und die Expansion und Detektion von antigenspezifischen T-Zellen in Gegenwart zahlreicher immunogener Fremd-Antigene (z.B. Adenovirus, Epstein-Barr-Virus oder Vakzinia-Virus Proteine) ist dabei problematisch. Eine detaillierte Auswertung von derartigen klinischen Studien erfordert die Entwicklung verbesserter Verfahren zur Analyse der Spezifität der CTL-Antwort. Mehrere Übersichtsartikel zur Tumormimmuntherapie bestätigen, daß die Weiterentwicklung von Methoden zur Quantifizierung eines derartigen immunologischen Parameters einen essentiellen Faktor bei der Verbesserung von rekombinanten Tumorigen darstellt (Gruij et al, 1999, Topalian 2001).

Die Entwicklung von Tumorigen zur Therapie CEA-exprimierender Tumore

Die Ergebnisse der bisherigen Studien zur Entwicklung von Impfstoffen zur Therapie CEA exprimierender Tumore deuten darauf hin, daß CEA, aufgrund der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen, im Menschen nur bedingt immunogen ist. In klinischen Studien konnten durch Vakzinen auf der Basis von Vaccinia Viren (Tsang et al., 1995), mit synthetischen Peptiden beladenen autologen dendritischen Zellen (Morse et al., 1999) oder anti-Idiotyp-

Antikörpern (Foon et al., 1997) zwar mit immunologischen Methoden detektierbare T-Zell Antworten induziert werden, eine objektive klinische Antwort konnte aber nicht dokumentiert werden. Unter der Annahme, daß CEA daher möglicherweise eher als Zielstruktur für passive Immuntherapien geeignet ist, wurde in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf die Entwicklung von Vakzinen auf der Basis von Muzin1 gelegt. In einer von Fong et al. kürzlich publizierten klinischen Studie wurde – nach Angaben der Autoren – erstmals eine objektive klinische Antwort dokumentiert, die CTL-Antwort mit der Tumorregression korreliert und damit belegt, daß dieser Parameter in der Tat geeignet ist, die Wirksamkeit von Tumorstoffen zu belegen (bzw. „vorherzusagen“, Fong et al., 2001). Der Impfstoff basierte auf autologen dendritischen Zellen, die mit den HLA-A2-immundominanten CEA-Peptiden beladen wurden. Wie bei der von Rosenberg et al. entwickelten Vakzine zur Therapie von Melanomen (siehe Kap. 2.3) wurden auch hier die Aminosäuresequenz der verwendeten Oligopeptide an einer Position variiert, um die Immunogenität zu erhöhen (altered peptide ligand vaccination). Jedoch wurden hier nicht die Ankerpositionen variiert, sondern interessanterweise eine an der T-Zell-Rezeptor-Interaktion beteiligte Aminosäure. Die so induzierten T-Zellen sind trotzdem in der Lage, auch das native, auf MHC-I präsentierte CEA-Peptid zu erkennen. In einer von Niethammer et al. publizierten Studie konnte vor kurzem erstmals die Induktion von vor Tumorwachstum schützender Immunität in CEA-transgenen Mäusen durch eine DNA-Vakzine gezeigt werden (Niethammer et al. 2001). Die Durchbrechung der Toleranz wird hier durch die Verwendung von *Salmonella Typhimurium* als „Träger“ der DNA erklärt. Diese attenuierten Bakterien werden nach oraler Verabreichung aus dem Darm über die M-Zellen aufgenommen und anschließend von Makrophagen phagozytiert. Dabei werden in den Bakterien enthaltene Plasmide freigesetzt.

Die Verwendung von MVA-infizierten dendritischen Zellen als Vakzine

Bei den Experimenten zum Einsatz von *in vitro* generierten, MVA infizierten dendritischen Zellen zur Immuntherapie ist der durch die Vakzine induzierte nicht-Antigen-spezifische Schutz problematisch (siehe Abb. 5-14). Dieses häufig beobachtete Phänomen beruht wahrscheinlich auf der sehr effektiven Induktion einer Immunantwort gegen in der Zellkultur vorhandene Fremd-Antigene: sowohl die dendritischen Zellen als auch die verwendeten Tumorzellen präsentieren Peptide aus in Rinderserum enthaltenen, artfremden (Xeno-) Antigenen. Um dieses Problem zu umgehen werden humane dendritische Zellen für immunologische Studien in humanem Serum (AB-Serum) oder serumfrei kultiviert (Anton et al., 1998). Methoden zur Generierung von murinen DC in FCS-freiem Medium sind bisher wenig effizient. Eigene Versuche, die dendritischen

Zellen oder die MC38-MUC1 Tumorzellen in serumfreien Medium zu kultivieren (Cell-Grow oder Ultrosor-G), verliefen nicht erfolgreich. Die zweite Injektion der 10-fachen Dosis MC38-MUC1 6 Wochen nach der letzten Vakzinierung führte zu Tumorstadium in den mit dendritischen Zellen vakzinieren Mäusen, Unterschiede zwischen den experimentellen und Kontrollgruppen sind jedoch hier nicht erkennbar (Abb. 5-15). Eine genaue Untersuchung der Wirksamkeit MVA-infizierter dendritischer Zellen im MC38-MUC1 / C57BL/6 – Tumormodell ist problematisch. Eine Lösungsmöglichkeit wäre z.B. die MC38-MUC1 Tumortransplantation, d.h. die Injektion resuspendierter Tumorzellen, die nicht in Zellkultur passagiert wurden. Dabei ist zu beachten, daß MC38-Tumore *in vivo* oft die Expression von Muzin herunterregulieren (Daten nicht gezeigt). Hier könnten z.B. spontane, durch mutagene Substanzen induzierte Tumore aus MUC1-transgenen Mäusen verwendet werden. Dies beseitigt nicht nur die Problematik der Präsentation von FCS-Proteinen und der instabilen Expression von Muzin auf *in vivo* kultivierten MC38-MUC1-Zellen, es ist auch ein der Situation im Menschen eher entsprechendes Tumormodell.

Wie dendritische Zellen gehören auch B-Zellen zu den professionellen Antigenpräsentierenden Zellen, exprimieren MHC-II und CD40 und können ebenfalls nach CD40Ligand-Stimulierung die Expression kostimulatorischer Moleküle hochregulieren (siehe Abb. 2-3). Eine Aktivierung von B-Zell-Lymphomzellen durch die Injektion von stimulierenden anti-CD40-Antikörpern führte in Mäusen zu einem Schutz vor B-Zell-Lymphomen (French et al., 1999). Durch die Verwendung von aktivierten P388-B-Zell-Lymphomzellen als Tumorstadium konnte in dieser Studie gezeigt werden, daß durch Kokultur mit CD40Ligand-exprimierenden Zellen aktivierte APC nicht nur erhöhte Mengen an kostimulatorischen Molekülen und MHC-Molekülen exprimieren, sondern auch wirksame Tumorstadium darstellen. Im Sonderfall eines aus einer APC hervorgegangenen Tumors (wie P388) ist dabei keine Kenntnis über die für die Immunität verantwortlichen Tumorstadium bzw. eine zusätzliche Infektion mit Tumorstadium-kodierenden Viren notwendig (siehe Abb. 5-16).

Mögliche Ursachen für die Unterschiedliche Wirksamkeit von Tumorkvakzinen auf der Basis von MVA und DNA

In Kapitel 5.1 wurde bereits erwähnt, daß die Anzahl der ursprünglich 22 *variable number tandem repeats* während der Klonierung des rekombinanten MVA-MUC1 wahrscheinlich abnimmt. Die genaue Anzahl der im MVA-Genom verbleibenden *tandem repeats* kann nur durch *Southern blotting* erfolgen, da aus den ebenfalls in Kap. 5.1.2 erläuterten Gründen die Analyse der molekularen Masse im *Western blot* problematisch ist. Die Ergebnisse der durchgeführten Chrom-Freisetzungstests sowie die im nächsten Abschnitt behandelte Analyse des Muzin-Moleküls mit Hilfe von Computerprogrammen, welche die wahrscheinlich immundominanten T-Zell-Epitope innerhalb eines Proteins detektieren, sprechen dagegen, daß die Deletion einiger der *tandem repeat* Sequenzen im C57BL/6 für die geringe durch MVA-MUC1 induzierte Tumormunität verantwortlich ist (siehe Abb. 6-1).

Mehrere Studien haben in den letzten Jahren die Wirkung von replikationskompetenten Vakzinia Viren auf den Reifezustand dendritischer Zellen untersucht und beschrieben, daß in infizierten humanen dendritischen Zellen die Hochregulierung des kostimulatorischen Moleküls CD80 sowie des Reifungsmarkers CD83 während der terminalen Reifung blockiert wird, und Apoptose induziert werden kann. Die von Vakzinia kodierte löslichen immunmodulatorischen Proteine können die Reifung infizierter und auch nicht-infizierter (*bystander*) dendritischer Zellen negativ beeinflussen. Reife dendritische Zellen werden dagegen von Vakzinia Viren nicht effektiv infiziert und sind möglicherweise auch nicht mehr in der Lage, Antigene effizient zu prozessieren. (Jenne et al., 2000, Jenne et al., 2001, Engelmayer et al., 1999, Brander and Walker, 2000) .

In der vorliegenden Studie konnte auch bei mit MVA infizierten humanen dendritischen Zellen eine verminderte Hochregulierung von CD83 bei der Reifung durch CD40Ligand (Abb. 5-8) oder LPS (Daten nicht gezeigt) beobachtet werden. In murinen dendritischen Zellen konnte nach MVA-Infektion eine verminderte Hochregulation von CD80 beobachtet werden (Abb. 5-8). Außerdem wird die LPS-induzierte Hochregulation von CD40 durch die Infektion verhindert. Während die Auswirkung auf die CD83 und CD86-Expression in mit (replikationskompetenten) Vakzinia-Viren infizierten dendritischen Zellen beschrieben ist, wurde die Inhibition der CD40-Hochregulation durch Vakzinia noch nicht beobachtet. Die kürzlich beschriebene, wichtige Funktion von CD40 auf antigenpräsentierenden Zellen wurde in Kapitel 2.2 (und Abb. 2-3) erläutert.

H2-Kb octamers Muzin									H2-Db nonamers Muzin											
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	score	Position	1	2	3	4	5	6	7	8	score	
702	R	R	K	N	Y	G	Q	L	22	457	S	A	P	D	N	R	P	A	L	29
558	T	G	V	S	F	F	F	L	21	45	S	T	E	K	N	A	V	S	M	25
582	S	T	D	Y	Q	E	L		21	703	C	R	R	K	N	Y	G	Q	L	20
5	T	Q	S	P	F	F	L	L	20	117	S	A	P	D	N	K	P	A	P	19
602	K	Q	G	G	F	L	G	L	20	481	S	A	S	G	S	A	S	T	L	19
593	I	S	E	M	F	L	Q	I	19	564	F	H	I	S	N	L	Q	F	N	19
745	D	R	S	P	Y	E	K	V	18	690	L	A	I	V	Y	L	I	A	L	19
719	A	R	D	T	Y	H	P	M	17	1	A	A	A	S	P	F	F	L	L	18
610	S	N	I	K	F	R	P	G	15	7	F	L	L	L	L	L	T	V	L	18
251	T	A	P	P	A	H	G	V	8	614	G	S	V	V	V	Q	L	T	L	18
271	T	A	P	P	A	H	G	V	8	645	A	A	S	R	Y	N	L	T	I	18
291	T	A	P	P	A	H	G	V	8	750	S	A	G	N	G	G	S	S	L	18
311	T	A	P	P	A	H	G	V	8	2	A	A	S	P	F	F	L	L	L	17
331	T	A	P	P	A	H	G	V	8	676	W	G	I	A	L	L	V	L	V	14
										558	S	F	F	F	L	S	F	H	I	12
										653	I	S	D	V	S	V	S	D	V	11
										137	S	A	P	D	T	R	P	A	P	9
										147	S	T	A	P	P	A	H	G	V	9
										157	S	A	P	D	T	R	P	A	P	9
										167	S	T	A	P	P	A	H	G	V	9
										177	S	A	P	D	T	R	P	A	P	9
										187	S	T	A	P	P	A	H	G	V	9
										197	S	A	P	D	T	R	P	A	P	9
										207	S	T	A	P	P	A	H	G	V	9
										217	S	A	P	D	T	R	P	A	P	9
H2-Kb octamers beta-Galactosidase																				
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	score											
1045	G	R	Y	H	Y	Q	L	V	22	137	S	A	P	D	T	R	P	A	P	9
588	A	F	R	Q	Y	P	R	L	21	147	S	T	A	P	P	A	H	G	V	9
129	D	A	P	I	Y	T	N	V	20	157	S	A	P	D	T	R	P	A	P	9
238	M	S	G	I	F	R	D	V	18	167	S	T	A	P	P	A	H	G	V	9
338	I	P	N	L	Y	R	A	V	18	177	S	A	P	D	T	R	P	A	P	9
532	I	C	P	M	Y	A	R	V	18	187	S	T	A	P	P	A	H	G	V	9

Abbildung 6-1: Mit Hilfe des Programms SYFPEITHI vorhergesagte K^b und D^b-MHC-I-Epitope des durch pCI-MUC1 kodierten Muzin und beta-Galactosidase. Die markierten Muzin-Epitope TGVSFFFL; STDYYQEL; SAPDNRPAL; STEKNAVSM; CRRKNYGQL mit den höchsten Werten wurden synthetisiert und auf ihre Fähigkeit zur Induktion von IFN-gamma in Milzzellen vakzinierter Mäuse getestet (das K^b-Oktamer RRKNYGQL ist bereits im D^b-Nonamer CRRKNYGQL enthalten). Als Beispiel für den Wert und die Position, die ein immundominantes Epitop haben sollte, ist die Berechnung der Werte für beta-Galactosidase aufgeführt. Das schattierte Epitop ICPMYARV ist das für die CTL-Detektion verwendete Peptid. Epitopen aus der Muzin-VNTR-Region werden sowohl für K^b als auch D^b niedrige Bindungswahrscheinlichkeiten zugeordnet (<10).

Durch den zytopathischen Effekt der Vakzinia-Infektion wird die Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese der Wirtszelle inhibiert (Moss, B. et al. in: *Current Protocols in Molecular Biology*, 1998, Band IV, Kapitel 16.15). Dieser Effekt kann für die Inhibierung bei der terminalen Reifung von dendritischen Zellen verantwortlich sein. In Kap. 2.2 wurde bereits erwähnt, daß die Antigenpräsentation auf unreifen APC Toleranz oder Anergie von naiven T-Zellen induzieren kann. Die Ergebnisse der *in vivo* Versuche und der phänotypischen Charakterisierung MVA infizierter dendritischer Zellen deuten darauf hin, daß MVA trotz der umfangreichen Deletionen im Genom und der damit verbundenen Attenuierung den Reifezustand dendritischer Zellen stark beeinträchtigt. Welche

molekularen Mechanismen für die sofortige Inhibition der Proteinbiosynthese in Vakzinia-infizierten Zellen verantwortlich sind, ist nicht bekannt. Eine entsprechende Manipulation des MVA-Genoms wäre denkbar. Die Grundlage dazu bietet das bereits vollständig sequenzierte Genom des Virus. Ein interessanter Aspekt wäre auch die Untersuchung, ob evt. die im Virus-Partikel enthaltenen Proteine (z.B. ein Kapsid-Protein) bei nicht-replikationskompetenten Viren eine dominante Rolle bei der Induktion zellulärer Immunität spielen. Durch Hepatitis-B Virus infizierte Zellen produzieren beispielsweise auch „leere“ Viruspartikel (*Hepatitis B surface antigen*). Diese DNA-freien Partikel sind dennoch in der Lage, Zellen zu „infizieren“ und – im Gegensatz zu anderen extrazellulären Antigenen – starke CTL-Antworten zu induzieren (J. Reimann, Ulm, pers. Kommunikation). Dieser Mechanismus würde die Beobachtung erklären, daß in mit MVA-LacZ vakzinierten Mäusen CD4 und CD8-T-Zellen gegen Vakzinia-Epitope problemlos detektierbar sind, nicht jedoch beta-Gal spezifische T-Zellen.

Bei der Injektion von DNA Vektoren in Muskelgewebe erfolgt die Induktion der zellulären Immunantwort wahrscheinlich nicht nur über die direkte Transfektion antigenpräsentierender Zellen (z.B. Makrophagen), sondern auch über den in Kapitel 2.2 bereits erläuterten Mechanismus des *cross primings*, bei dem eine hohe Expressionsrate des Antigens sehr wichtig ist. Man vermutet, daß dendritische Zellen diejenigen Zellen sind, die CD8-T-Zell-Antworten nicht nur gegen intrazelluläre sondern auch extrazelluläre Antigene induzieren können. Auf bisher nicht genau geklärte Art und Weise werden Antigene nach der Aufnahme durch dendritische Zellen aus den Endosomen in das Zytosol transportiert, oder werden nach der Aufnahme in den Endosomen in Form von Peptiden an MHC-I Moleküle gebunden („MHC-Recycling“). Die Aktivierung von naiven T-Zellen durch diesen Mechanismus ist abhängig von der durch CD4-T-Zellen (oder Ersatzweise von CD40Ligand) vermittelten „Hilfe“ oder von inflammatorischen Zytokinen (z.B. induziert durch virale oder bakterielle Infektionen) (Larsson et al., 2001). *Cross priming* spielt auch eine Rolle bei der Induktion von CTL-Antworten durch rekombinante Vakzinia Viren (Larsson et al., 2001) oder bei Vakzinen auf der Basis von virusinfizierten dendritischen Zellen (Cayeux et al., 1999). Zur Induktion einer T-Zell Antwort durch diesen Mechanismus ist vor allem eine hohe Expressionsrate des Antigens notwendig. Die Expression von Muzin und GFP in mit rekombinanten MVA-Viren infizierten Zellen ist aber in dendritischen Zellen wesentlich geringer als in permissiven Wirtszellen (CEF, vergleiche Abb. 5-3, 5-6, 5-7).

Die Inhibition der Reifung dendritischer Zellen durch immunmodulatorische Mechanismen oder den zytopathischen Effekt, die im Vergleich zur Immunantwort gegen virale Epitope geringe Induktion von CTL gegen das Transgen sowie die geringe Expressionsrate in primären Mauszellen können erklären, warum MVA erfolgreich als Pockenimpfstoff

eingesetzt werden konnte, die rekombinanten Viren aber nicht vor MC38-MUC1 oder MCA205-beta-Gal-Tumorwachstum in Mäusen schützen. Im Gegensatz dazu belegen zahlreiche Studien einen durch DNA Vakzinierung induzierten unspezifischen immunstimulatorischen Effekt. In der DNA Präparation vorhandene Restmengen an bakteriellen Produkten – wie beispielsweise Lipopolysaccharide – können die Freisetzung inflammatorischer Zytokine induzieren. Aber auch hochreine bakterielle DNA stimuliert durch einen bisher nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus verschiedene Effektormechanismen, die zur Aktivierung von NK Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen führen. Für diesen Effekt sind in der Plasmid DNA vorhandene immunstimulatorische Sequenzen, die unmethylierte CpG-Dinukleotide enthalten, verantwortlich. In Vertebraten beschränkt sich das Vorkommen unmethylierter CpG-Motive überwiegend auf aktiv transkribierte Promotoren (*CpG-islands*). Vermutlich reagiert der Organismus auf eine vermeintliche mycobakterielle Infektion und reagiert mit einer Immunantwort des TH1-Typs (Induktion von IFN-gamma, IL-12, IL-18). Dieses Zytokinprofil ist nicht nur bei der Eliminierung intrazellulärer Pathogene, sondern auch bei der Induktion einer Anti-Tumor-Antwort wirksam (*Abstract Q26: Schott, M, Abstract R12, R33: Schlamp, A, Abstract R39: Uthermöhlen, O, Abstract R46: Wagner, S.N. et al., Joint Annual Meeting of Immunology, Düsseldorf, 2000, zu finden unter <http://www.uni-duesseldorf.de/dgfi2000/main/index.htm>*).

Aktuelle Studien zum Einsatz rekombinanter MVA-Viren als Impfstoffe

Bis heute ist die bereits mehrfach erwähnte Publikation von Carroll et al. die einzige Studie, die demonstriert, daß Tumorstoffe auf der Basis von MVA-Viren im Tiermodell einen wirksamen Schutz vor Tumorwachstum bieten (Carroll, M.W. et al., 1997). Die **intratumorale** Injektion von MVA-Viren, die das Papillomavirusprotein E2 kodieren, kann ebenfalls das Wachstum von VX2-Zellen (Kaninchen-Papillomakarzinomzellen) in Kaninchen inhibieren. Eine tumorspezifische CTL-Antwort wurde nicht detektiert. Die Autoren erklären die Tumorrepression – zumindest teilweise – mit der negativen Wirkung des E2-Genprodukts auf die Expression der Papilloma-Onkogene E6 und E7, und damit auf die Proliferation der Tumorzellen. Der experimentelle Ansatz ist daher nicht mit herkömmlichen immuntherapeutischen Ansätzen zu vergleichen (Rosales, C. et al., 2000, Valdez Graham, V. et al., 2000). Drexler et al. konnten zeigen, daß MVA-Viren, die das Melanom-Differenzierungsantigen Tyrosinase kodieren, in HLA-A2-transgenen Mäusen CTL induzieren, die *in vitro* humane (HLA-A2 positive) Tyrosinase exprimierende Tumorzellen lysieren. Ob die induzierte CTL Antwort stark genug ist, um *in vivo* Tumorwachstum zu kontrollieren, wurde nicht gezeigt.

Pathogen:	Autor:	Bemerkung:
SIV (simian immunodeficiency virus)	Sharpe, S. et al., 2001	MVA Vakzine induziert CTL in Rhesusaffen
	Nilsson, C. et al., 2001	Kombination aus MVA / Semliki Forest Virus Vakzine induziert CTL, schützt aber nicht vor SIV Infektion
	Barouch, D.H. et al., 2001	MVA Vakzinen und DNA Vakzinen induzieren CTL und schützende Immunität in Rhesusaffen
	Ourmanov, I. et al., 2000 Seth, A. et al., 2000	MVA Vakzine schützt nicht vor SIV Infektion, führt aber zur Inkuktion von CTL, reduzierter Viruslast und erhöhter Überlebensrate in Rhesusaffen
HIV (human immunodeficiency virus)	Amara, R.R. et al., 2001	Kombination aus DNA und MVA-Vakzine induziert CTL und signifikanten Schutz vor HIV Infektion in Rhesusaffen
	Allen, T.M. et al., 2000	DNA / MVA – Epitop-Vakzine induziert sehr starke CTL-Antwort (20%) in Rhesusaffen
Masern-Virus	Weidinger, G. et al., 2001	MVA induziert Antikörper und TH1 Antwort im cotton rat-Tiermodell
	Stittelaar, K.J. et al., 2001	MVA induziert Antikörper, CTL und Schutz vor Infektion in Rhesusaffen
Influenza-Virus	Sutter, G., 1994	MVA induziert Antikörper, CTL und Schutz vor Infektion in Mäusen
Dengue-Virus	Men, R.R. et al., 2000	MVA induziert neutralisierende Antikörper und partiellen Schutz vor Infektion in Rhesusaffen
EHV-1 (equine herpesvirus)	Huemer, H.P. et al., 2000	MVA induziert CTL in Hamstern
Mycobacterium Tuberculosis	McShane, H. et al., 2001	MVA induziert CD4-Anwort und schützende Immunität im Mausmodell, vor allem in Kombination mit einer DNA-Vazine
Plasmodium (Malaria)	Schneider, J. et al., 2001 und 1998	Kombination aus DNA und MVA-Vakzine induziert CTL und signifikanten Schutz vor Malaria Infektion in Mäusen und Schimpansen

Abbildung 6-2: Einsatz von rekombinanten MVA-Impfstoffen in Tiermodellen

Im Gegensatz dazu wurde in einer grossen Zahl von Studien demonstriert, daß MVA zur Induktion von schützender Immunität vor allem gegen virale, aber auch bakterielle oder eukaryotische Pathogene eingesetzt werden kann (siehe Abb. 6-2).

Chen et al. haben einen direkten Vergleich von Vakzinen auf der Basis von (replikationskompetenten) Vakzinia Viren und DNA zur Therapie von Tumoren, die Papillomavirus-Tumorantigene exprimieren, im Mausmodell durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse sind mit den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten zur Wirksamkeit von DNA und MVA-Tumorvakzinen vergleichbar: Während die viralen Impfstoffe maximal 40% aller Tiere schützten, wurde mit der DNA-Vakzine ein 100%iger Schutz erzielt. Die DNA Vakzine induziert antigenspezifische IFN γ sezernierende CD4-Zellen, während durch Vakzinia Impfstoffe induzierte CD4-Zellen sowohl IFN γ als auch das TH2 Zytokin IL4 sezernieren. In IL4-Knockout Mäusen stellen Vakzinia Viren eine wirksamere Tumorstoffe dar (Chen, C.H. et al., 2001).

Analyse der durch die Vakzinen induzierten Immunantwort

Falls im Tiermodell gezeigt werden kann, daß die entwickelte Vakzine einen wirksamen Schutz vor Tumorstoffen bietet, kann in weiteren Tiermodellen oder in klinischen Phase I Studien untersucht werden, ob die Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können. Experimente mit immunkompetenten Mäusen und Tumor-Zelllinien, die humane Tumorantigene exprimieren, sind natürlich nur bedingt auf den Menschen zu übertragen. Es stehen jedoch eine Reihe von "humanisierten" Tiermodellen zur Verfügung, beispielsweise transgene Mäuse, die humane MHC-Moleküle exprimieren, Mäuse die humanes Muzin epithelial als Selbst-Antigen exprimieren (Tempero, R.M. et al., 1998) oder Mäuse, die spontan Muzin-exprimierende Tumore entwickeln (Graham R.A. et al., 1995) Auf *in-vivo* Experimente kann aufgrund der in 2.2 beschriebenen Komplexität der Entstehung von Immunität nicht verzichtet werden. Neben dem Schutz vor Tumorstoffen ist der Nachweis von Antigen-spezifischen Antikörpern und zytotoxischen T-Zellen der wichtigste Aspekt bei der Analyse der Wirksamkeit eines Impfstoffs. In klinischen Phase I Studien ist – neben der Überprüfung der Toxizität - der Nachweis der Induktion einer zellulären oder humoralen Antwort sogar das wichtigste Ziel. Die Detektion von Antikörpern gelingt in der Regel sehr gut durch die wenig aufwendige ELISA-Methode, wohingegen es nach wie vor keine Standard-Methode zum Nachweis beliebiger, antigenspezifischer T-Zell-Antworten gibt (Übersichtsartikel: Romero et al., 1998, Yee et al., 2001). Zytotoxische T-Zellen spielen aber *in vivo* möglicherweise die wichtigste Rolle bei der Eliminierung von Tumorzellen (Roth, C. et al., 1994). Eine einfache Methode zum qualitativen Nachweis von antigenspezifischen CTL ist der Chrom-

Freisetzungstest bei dem die während einer 4-stündigen Kokultur aus ^{51}Cr -markierten Zielzellen freigesetzte Radioaktivität als Nachweis für CTL-vermittelte Lysis dient. Eine spezifische Lysis setzt allerdings eine spezifische CTL Frequenz von mindestens 1 in 1000 CD8+ Zellen voraus (Romero et al., 1998). Diese Frequenz wird meist nur nach der *in vitro* Expansion antigenspezifischer T-Zellen in der Gegenwart von Antigen und dem T-Zell Wachstumsfaktor Interleukin-2 erreicht. Bei dem wesentlich aufwendigeren *limiting dilution assay* werden eine große Anzahl von Mikrokulturen angesetzt, von denen nur einige lytische Aktivität zeigen. In der Annahme, daß die Lysis auf einen einzigen T-Zell Klon zurückzuführen ist, kann man mit statistischen Methoden die ursprüngliche CTL-Frequenz quantitativ bestimmen. Bei beiden Verfahren kann die durch NK-Zellen induzierte Lysis problematisch sein, die ebenfalls in Gegenwart von Interleukin 2 aktiviert werden und dann Lymphokin-aktivierte Killer-Zellen oder LAK-Zellen genannt werden (Lotze et al., 1980). Falls ein geeignetes Antigen zur Expansion spezifischer CTL und geeignete syngene Zielzellen vorhanden sind, ist der Chrom-Freisetzungstest die einfachste Methode zum Nachweis von Tumorantigen-spezifischen CTL.

Wesentlich empfindlicher sind neuere Methoden, die auf der Detektion der von T-Zellen produzierten Zytokine oder der direkten Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten rekombinanten MHC-Peptid-Komplexen basieren. Um eine für die durchflußzytometrische Analyse ausreichende Stabilität der Bindung zwischen dem T-Zell Rezeptor und dem MHC-Komplex zu gewährleisten, müssen die MHC-Komplexe als Tetramere oder Oktamere vorliegen (Altman et al., 1996). Die Methode setzt natürlich voraus, daß die immundominanten T-Zell Epitope bekannt sind.

Durch den *enzyme linked immunospot test* (ELISPOT) können einzelne T-Zellen detektiert werden, die durch Antigen-Kontakt induzierte Zytokine (z.B. IFN-gamma, IL-2, TNF-alpha, IL-4, IL-5 oder IL-10, (Romagnani, 1995) sezernieren. Dabei werden die freigesetzten Zytokine durch an die Oberfläche von 96-Loch Mikrotiterplatten gebundene Antikörper fixiert und mit Hilfe eines zweiten, alkalische Phosphatase oder Peroxidase konjugierten Antikörpers in Form kleiner Flecken sichtbar gemacht.

In den letzten Jahren ist auch eine Methode zur durchflußzytometrischen Detektion von antigenspezifischen T-Zellen durch eine intrazelluläre Färbung der aufgrund des Antigenkontakts exprimierten Zytokine entwickelt worden. Durch Brefeldin A wird die Sekretion der Zytokine blockiert. Die Mult-Parameter-FACS-Analyse ermöglicht sowohl die phänotypische Charakterisierung einzelner Zellen (z.B. CD8 oder CD4), wie auch die Charakterisierung der Immunantwort anhand der sezernierten Zytokine (z.B. TH1 oder TH2) (Kern et al., 1998, Kowalczyk et al., 2000). Die immundominanten T-Zell Epitope des Antigens beta-Galactosidase sind für verschiedene Mausstämme beschrieben. Durch

in vitro Expansion mit synthetischen 8 bis 10meren gelingt der Nachweis von beta-Gal-spezifischen T-Zellen – beispielsweise durch ELISPOT (Ramirez et al., 2000) oder den Chrom-Freisetzungstest (Cayeux et al., 1999).

Durch Modifikation einer von Kern et al. beschriebenen Methode der intrazellulären Interferon-gamma Färbung (Kern et al., 1998) konnte, unter Verwendung des im ELISPOT erfolgreich zur Detektion von beta-Gal spezifischen CTL eingesetzten Oligopeptids, eine Methode entwickelt werden, mit der – im Gegensatz zu ELISPOT oder dem Chrom-Freisetzungstest – die Detektion von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen quantitativ und ohne mehrtägige *in vitro* Expansion spezifischer T-Zell Klone gelingt. Das Verfahren kann vollständig in 96-Loch Mikrotiterplatten durchgeführt werden, was zu einer wesentlichen Einsparung von Reagenzien und Arbeitsaufwand führt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß eine Vakzine, die mit der entwickelten Methode detektierbare Mengen an Tumorantigen-spezifischen T-Zellen induziert, vor einer letalen Tumordosis schützt (vergleiche Abb. 5-17 und 5-21). Zur Induktion von Interferon-gamma sind keine hochreinen Peptide erforderlich: Die Methode funktioniert mit gleicher Effizienz bei Verwendung von 10µg/ml des immundominanten Oligopeptids oder bei 2µg/ml und bei Gegenwart von 8µg/ml eines Gemisches verschiedener irrelevanter Peptide (Daten nicht gezeigt). Daher eignet sich das entwickelte Verfahren zur Suche nach unbekanntem T-Zell-Epitopen ebenso wie zur T-Zell-Analyse im Menschen. Bedingt durch die Polygenie und den Polymorphismus des HLA-Locus spielen beim Menschen wahrscheinlich wesentlich mehr verschiedene immundominante T-Zell Epitope in Tumorantigenen im Vergleich zu syngenen Mausstämmen eine Rolle. Durch die Verwendung von MVA-infizierten dendritischen Zellen zur Restimulierung von CTL gelingt mit dem Verfahren auf sehr einfache Art und Weise auch der gleichzeitige quantitative Nachweis von Vakzinia spezifischen T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen.

In mit pCI-beta-Gal vakzinierten Tieren wird durch *boosting mit* pCI-beta-Gal eine deutlich stärkere beta-Gal-spezifische CTL-Antwort induziert, als durch *boosting mit* MVA-beta-Gal, was die bessere Schutzwirkung der reinen DNA Vakzine erklärt. Gegen Vakzinia Epitope gerichtete Antikörper (Abb. 5-18c) sowie T-Helferzellen und CTL (5-23b und 5-24) sind dagegen bereits nach einer einmaligen Injektion von MVA meßbar. In einem ähnlichen Modell konnte in BALB/C Mäusen durch eine einzige Vakzinierung mit 10^6 oder 10^8 PFU (ebenfalls unter der Kontrolle des p11 Promotors) beta-Galactosidase exprimierender MVA Viren ein Schutz vor beta-Gal-positiven CT26 Tumorzellen erreicht werden (Carroll et al., 1997) Dieses Ergebnis beruht möglicherweise auf Unterschieden im Tumormodell, z.B. der intravenösen statt subkutanen Tumoringektion, oder auf der unterschiedlichen Fähigkeit der verschiedenen Mausstämme, beta-Galactosidase Epitope zu präsentieren. Ramirez et al. konnten zeigen, daß MVA-beta-Gal (wieder unter

Verwendung des p11 Promotors) in BALB/C Mäusen eine CTL-Antwort induziert, die Detektion verlangte aber eine 5-tägige *in vitro* Expansion der antigenspezifischen T-Zellen mit dem H-2^d MHC-I-Epitop TPHPARIGL (Ramirez, J. et al., 2000).

Durch einen 4h-Chrom-Freisetzungstest gelang der Nachweis von durch die Immunisierung induzierten Muzin-spezifischen CTL nicht: Mit keinem der vorhandenen Antigene (synthetische MUC1-*tandem repeat* 60mere und 105mere oder bestrahlte MC38-MUC1 Stimulatorzellen) konnten selektiv Muzin-spezifische CTL expandiert und nachgewiesen werden. Die beobachtete Lysis beruht möglicherweise auf durch die 5-tägige Restimulation in Gegenwart von IL-2 induzierte LAK-Zellen oder CTL, die nicht Muzin, sondern andere, auf MC38-Zellen präsentierte Antigene erkennen.

Die Anwendung von Programmen zur Vorhersage von Epitopen, die auf MHC-I-Molekülen von C57BL/6 Mäusen (K^b, D^b) gebunden werden, bestätigt, daß innerhalb der VNTR-Sequenz keine MHC-I bindende Oligopeptide zu erwarten sind (siehe Abb. 6-1). Durch den Vergleich mit der Sequenz bekannter Epitope – insbesondere an den Ankerpositionen – werden von einem von Stefan Stefanovic et al. am Institut für Immunologie der Universität Tübingen entwickelten und *online* zugänglichen Programm (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>) allen möglichen Octa- bzw. Nonameren eines Proteins ein Wert zugeordnet, der die Bindungsaffinität eines Oligopeptids zu der peptidbindenden Spalte im MHC-Molekül beschreibt. Hohe Werte, im Bereich der berechneten Werte bekannter T-Zell-Epitope, bedeuten dabei eine hohe Bindungsaffinität. Ob jedoch diese Oligopeptide auch während der Antigenprozessierung entstehen und auf MHC-Molekülen präsentiert werden, hängt natürlich auch noch von anderen Faktoren ab, in erster Linie wahrscheinlich von den proteasomalen Abbauprozessen und von dem selektiven Transport der Peptide durch den TAP Transporter (siehe auch Abb. 2-2). Bei Anwendung des Programms SYFPETHI beträgt die Wahrscheinlichkeit – laut Angaben des Entwicklers - 80%, daß bei der Analyse der besten 2% aller möglichen Oligopeptide das *in vivo* immundominante Epitop gefunden wird (persönliche Kommunikation, Stefan Stefanovic). Fünf Peptide mit hoher Bindungswahrscheinlichkeit und ohne Homologie zum Maus-MUC1-Gen wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit je fünf mit pCI-MUC1 vakzinierten Mäusen mit Hilfe des entwickelten Testsystems untersucht. Diese Peptide konnten jedoch in keinem der Tiere eine signifikante IFN-gamma Produktion induzieren (Daten nicht gezeigt).

Durch *in vivo* Depletion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Gong et al., 1997) oder durch adoptiven Transfer von T-Lymphozyten (Graham et al., 1996) konnte bereits bestätigt werden, daß sowohl T-Helferzellen als auch zytotoxische T-Zellen wichtig zur Entstehung von Immunität gegen Muzin-exprimierende Tumore in C57BL/6 Mäusen sind.

Das ungehemmte Wachstum von MC38-MUC1-Zellen in mit mock-DNA vakzinierten Mäusen und von MC38-WT-Zellen in mit pCI-MUC1 vakzinierten Mäusen belegt, daß eine antigenspezifische Immunreaktion für den Schutz vor MC38-MUC1-Tumoren in den mit pCI-MUC1 vakzinierten Mäusen verantwortlich ist (Vergleiche Abb. 5-8). Die schwache humorale Antwort ist ein Hinweis auf eine Induktion einer überwiegend zellvermittelten Immunität. In mit pCI-LacZ vakzinierten Tieren ist eine beta-Galactosidase spezifische CTL-Antwort dagegen eindeutig nachweisbar. Bis zu 1 in 550 CD8⁺ Zellen (im Durchschnitt 1 in 1700) erkennen das K^b-immundominante Epitop ICPMYARV in mehreren unabhängigen Experimenten. Da mit der entwickelten Methode theoretisch problemlos eine große Zahl von Peptiden getestet werden können (z.B. bei *pools* von 5 Peptiden/Vertiefung 480 Peptide auf einer Mikrotiterplatte) ist lediglich die kostenaufwendige Peptidsynthese der begrenzende Faktor. Die Beschränkung auf die von Computerprogrammen vorhergesagten immundominanten Epitope war in dieser Studie nicht erfolgreich.

Es existieren verschiedene „humanisierte“ Mausmodelle, die humane HLA-Moleküle exprimieren. Das T-Zell-Repertoire und die Prozessierung von Antigenen in Mäusen und im Menschen zeigen eine relativ große Übereinstimmung (Shirai et al., 1995, Wentworth et al., 1996). Problematischer ist die weniger effiziente Interaktion von humanen HLA-Molekülen mit murinem CD8 (auf der T-Zelle) die für die Erkennung von MHC-Klasse I Molekülen durch den T-Zell-Rezeptor notwendig ist (siehe Abb. 2-2). Die Folge kann die bevorzugte Induktion von H-2 restringierten T-Zellen sein (Firat et al., 1999). Inzwischen wurden HLA-A2 transgene Mäuse konstruiert, bei denen die CD8-bindende Domäne im HLA-A2-Molekül gegen die murine ausgetauscht wurde und durch *knockout* weder K^b noch D^b Moleküle exprimieren. Diese Mäuse exprimieren ausschließlich HLA-A2.1-Moleküle, welche korrekt mit murinem CD8 und β 2-Mikroglobulin interagieren (Ureta-Vidal et al., 1999).

Bei der geplanten Untersuchung der Wirksamkeit von pCI-MUC1 in HLA-A2 transgenen Mäusen ist die Definition der T-Zell-Epitope mit der entwickelten Methode nicht nur ein weiteres wichtiges präklinisches Modell sondern kann auch wichtige Informationen für die Immuntherapie liefern: Die so definierten MHC-I Peptide sind nicht nur zum *Immunmonitoring* im Menschen, sondern auch als Peptidvakzine (z.B. in Form von antigenbeladenen dendritischen Zellen) oder genetische Vakzine einsetzbar. Diese auch „*minigene*“ oder Multi-Epitop-Vakzinen werden bereits in verschiedenen Studien zur Induktion von CTL-Antworten gegen virale Pathogene (HIV) getestet (Hanke and McMichael, 1999, Wong et al., 1998). Rosenberg et al. haben 1998 in einer klinischen Studie die Wirksamkeit von HLA-A2-bindenden synthetischen Peptiden zur Therapie von Melanomen demonstriert (Rosenberg et al., 1998). Als Impfstoff wurden hier Peptide mit

veränderten Aminosäuren in den „Ankerpositionen“ um die Bindungsaffinität zum HLA-A2-Molekül weiter zu verstärken. Durch derartige Peptid-Vakzinen konnten in Kombination mit IL2 bei über 40% aller Patienten eine klinische Reaktion beobachtet werden.

Melanome gehören zu den relativ immunogenen Tumoren und mittlerweile sind über 20 Melanom-assoziierte Antigene beschrieben (sowohl Fremd- als auch Selbst- und Differenzierungs-Antigene, Topalian 2001). Bei den Studien von Rosenberg et al. wurde deutlich, daß auch aktive Impfstoffe auf der Basis des auf vielen Melanomen überexprimierten Selbst-Antigens gp100 zur Therapie etablierter Tumore einsetzbar sind. Die Beobachtung von Vitiligo bei erfolgreich therapierten Patienten weist darauf hin, daß Tumormunität und Autoimmunität in diesem Fall nahe beieinander liegen. Die Anzahl der bisher in klinischen Studien größeren Umfangs zur Tumorthherapie eingesetzten immunmodulatorische Maßnahmen, deren Wirksamkeit die Wirksamkeit eherkömmlicher Chemo- oder Strahlentherapien erreicht, ist relativ gering. Dazu gehören die bereits erwähnten Beispiele der aktiven Vakzinierung unter Einsatz HLA-bindender synthetischer Peptide, die passive Immuntherapie von Lymphomen oder Leukämien und mit großer Wahrscheinlichkeit auch die prophylaktische aktive Vakzinierung gegen Hepatitis-B. Durch die Fortschritte bei der Identifikation von Tumorantigenen, den Methoden zur Detektion von tumorspezifischen CTL und der Aufklärung der molekularen Ursachen für die Tumorentstehung und der Resistenz vieler Tumore gegenüber der „Immunüberwachung“ lassen hoffen, daß in Zukunft auch bei weiteren Tumorarten wirksame Immuntherapien entwickelt werden können.

Ausblick

Die Ergebnisse der DNA-Vakzine im Tiermodell sprechen für eine Weiterentwicklung und einen möglichen klinischen Einsatz. Als weiteres präklinisches Tiermodell kann z.B. in HLA-A2-transgenen oder MUC1-transgenen Mäusen geklärt werden, ob auch in diesem „humanisierten“ Tiermodell eine zelluläre Immunantwort induziert werden kann, Toleranz gegen Selbst-Antigene durchbrochen werden kann, und welche Folgen eine eventuell ausgelöste Autoimmunität hat. Ob durch eine DNA Vakzinierung in Mäusen, die humanes MUC1 als Selbst-Antigen exprimieren, eine CTL-Antwort induziert werden kann, ist nicht bekannt. Ergebnisse einer von Carmon et al. durchgeführten Studie in HLA-A2.1-transgenen Mäusen deuten darauf hin, daß die HLA-A2.1 restringierten Muzin-T-Zell-Epitope LLLTVLTVV, NLTISDVSV und ALASTAPPV auf primären (humanen) Tumoren präsentiert werden, von CTL erkannt werden können als Impfstoff eingesetzt werden können (Carmon, L. et al, 2000). In einer anderen Studie wurde STAPPAHGV als HLA-A2-1 Epitop identifiziert (Pietersz, G.A. et al., 2000). In den genannten Studien wurden

Programme zur Vorhersage HLA-A2 bindender Peptide erfolgreich eingesetzt. Mit der in dieser Studie entwickelten Methode könnten *pools* aller möglichen Oligopeptide systematisch durchgetestet werden. Anhand der Aminosäuresequenz jedes der durch diese Methode (und nicht durch Epitop-Vorhersagen) detektierten immundominanten Peptide können verbesserte Algorithmen zur Berechnung der Bindungswahrscheinlichkeit an MHC-I entwickelt werden. Auch die klinische Relevanz immundominanter Muzin-T-Zell-Epitope rechtfertigt auch den mit der Peptidsynthese verbundenen Kostenaufwand.

Ergebnisse von ersten klinischen Studien deuten darauf hin, daß mit geeigneten Vakzinen die Induktion einer CTL-Antwort gegen Muzin im Menschen möglich ist, ohne Autoimmunreaktionen zu induzieren. Durch Vakzinierung mit Fusionen aus Muzin-exprimierenden primären Tumorzellen und dendritischen Zellen konnten von Kugler et al. in zwei von 17 Patienten zytotoxische T-Zellen induziert werden, die das HLA-A2 restringierte Muzin Epitop LLLLTVLTV erkennen (Brossart et al., 2000; Kugler et al., 2000). Bei diesen Patienten konnte eine vollständige bzw. partielle Eliminierung der Metastasen beobachtet werden. Sowohl die Beobachtung, daß mit Muzin-exprimierenden Tumorzellen fusionierte, *in vitro* generierte dendritische Zellen in der Lage sind, Toleranz gegen Selbst-Antigene zu durchbrechen, als auch die Beschreibung des Peptids LLLLTVLTV als HLA-A2-bindendes T-Zell Epitop sind Ergebnisse aus Experimenten mit HLA-A2 bzw. MUC1-transgenen Mäusen. Einige der von Kugler et al. verwendeten Methoden erwiesen sich jedoch als nicht replizierbar und die zunächst als Meilenstein in der Tumorimmunologie bewertete Studie wurde daraufhin stark kritisiert (Birmingham 2001).

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Vergleich sowie die Analyse neuerer Studien zur Tumorummuntherapie lassen erwarten, daß DNA-Vektoren effektiver zur Induktion von Tumorummunität eingesetzt werden können, als MVA-Vektoren. Die Toleranz des Immunsystems gegenüber Selbst-Antigenen ist – bei der Wahl geeigneter Vakzinen – nicht notwendigerweise ein Hindernis bei der Entwicklung wirksamer Tumorimpfstoffe. Eine wichtige Rolle werden dabei in Zukunft der Einsatz von Kombinationen verschiedener Vektoren, Vakzinen auf der Basis von dendritischen Zellen und Vakzinen auf der Basis MHC-bindender Oligopeptide spielen. Die Analyse der immundominanten Epitope in Tumorantigenen wird dabei wichtige Informationen für die Entwicklung und Bewertung von Tumorimpfstoffen darstellen.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Tumorimpfstoffe auf der Basis des Plasmid-Vektors pCI, *modified vaccinia virus Ankara* (MVA) und MVA-infizierten dendritischen Zellen entwickelt und durch Sequenzierung, *Western blotting* und durchflußzytometrische Analyse überprüft. Die *in vivo* Wirksamkeit der Vakzinen wurde in verschiedenen Tumormodellen in C57BL/6 Mäusen verglichen. Die auf dem eukaryotischen Expressionsvektor pCI basierende DNA-Vakzinierung induzierte einen sehr wirksamen, antigenspezifischen und langfristigen Schutz vor Muzin, CEA oder beta-Galactosidase exprimierenden Tumoren. Eine MVA-Vakzinierung bietet in den in dieser Arbeit durchgeführten Tumormodellen keinen signifikanten Schutz vor Muzin oder beta-Galactosidase exprimierenden Tumoren.

Sowohl humane, als auch murine *in vitro* generierte dendritische Zellen lassen sich mit MVA – im Vergleich zu anderen viralen Vektoren – sehr gut infizieren. Die Expressionsrate der eingefügten Gene ist aber gering im Vergleich zur Expression in permissiven Wirtszellen des Virus (embryonale Hühnerfibroblasten). Es konnte gezeigt werden, daß eine MVA-Infektion dendritischer Zellen ähnliche Auswirkungen auf den Reifezustand humaner und muriner dendritischer Zellen hat, wie eine Infektion mit replikationskompetenten Vakzinia-Stämmen, und außerdem die Hochregulation von CD40 während der terminalen Reifung von murinen dendritischen Zellen inhibiert wird. Die während der langfristigen *in vitro* Kultur auf CEF-Zellen entstandenen Deletionen im MVA Genom führten zu einer starken Attenuierung und dem Verlust einiger Gene, die immunmodulatorische Proteine kodieren, jedoch nicht zu einer Verminderung des zytopathischen Effekts in dendritischen Zellen.

Die geringe Expressionsrate und die beobachtete Inhibition der Expression kostimulatorischer Moleküle auf dendritischen Zellen kann für eine wenig effektive Induktion einer Immunantwort in MVA vakzinierten Tieren durch *cross priming* oder die direkte Infektion antigenpräsentierender Zellen verantwortlich sein.

Durch die Modifikation einer Methode zur intrazellulären IFN-gamma Färbung konnten in vakzinierten Mäusen tumorantigenspezifische CTL sensitiv und quantitativ detektiert werden. Die so bestimmte CTL-Frequenz, nicht jedoch die humorale Antwort, korrelierte mit der *in vivo* Wirksamkeit der verschiedenen Vakzinen: DNA vakzinierte Tiere entwickeln starke tumorantigenspezifische CTL-Antworten, wohingegen in MVA-vakzinierten Tieren überwiegend gegen virale Epitope gerichtete CD4 und CD8-T-Zellen detektiert wurden.

Die Wirksamkeit der pCI-DNA-Vakzine spricht für die Weiterentwicklung in weiteren präklinischen Mausmodellen, beispielsweise unter Verwendung von MUC1 oder HLA-A2 transgenen Mäusen. Die Methoden zur Detektion Tumorantigen-spezifischer CTL in 96-Loch-Mikrotiterplatten können dabei zur systematischen Suche nach im Menschen immundominanten T-Zell-Epitopen im Muzin-Molekül genutzt werden.

Der durchgeführte Vergleich der auf den Vektoren pCI und MVA basierenden Vakzinen und die Analyse neuerer Publikationen führen zu dem Ergebniss, daß vor allem DNA-Vakzinen in Zukunft eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von aktiven Tumorimpfstoffen spielen werden. Rekombinante MVA-Viren, eventuell in Kombination mit DNA- oder anderen Vektoren, haben sich dagegen in zahlreichen Studien als wirksame Impfstoffe zur Kontrolle von durch Pathogene hervorgerufenen Infektionserkrankungen erwiesen.

8 Summary

In this study, tumor vaccines based on the plasmid pCI, the attenuated vaccinia virus strain *modified vaccinia virus Ankara (MVA)* and MVA-infected dendritic cells were constructed and characterized by sequencing, Western blot and flow cytometric analysis. The efficiency to induce tumor immunity *in vivo* was compared in several C57BL/6 mouse tumor models. Naked DNA Vaccination based on the eukaryotic expression vector pCI did induce very effective, antigen-specific and long-term protection against tumor cell lines expressing mucin, CEA or beta-Gal whereas MVA vaccination did not elicit protective immunity against Mucin or beta-Gal expressing tumors. MVA does infect human or murine *in vitro* generated dendritic cells very efficiently compared to other viral vectors, however expression levels of the inserted antigens in dendritic cells are significantly lower than in permissive host cells (chicken embryo fibroblasts).

It could be shown that the effect of MVA infection on the maturation status of dendritic cells is similar to the effects described for dendritic cells infected with replication competent vaccinia strains. In addition it was shown that the upregulation of the important costimulatory molecule CD40 through LPS stimulation is strongly inhibited in MVA infected cells. During passage in tissue culture, MVA has accumulated a number of large deletions, including a number of immunomodulatory molecules and resulting in a strong attenuation. However the strong cytopathic effect on dendritic cells is maintained.

The low level of expression and the effect on dendritic cell maturation may be responsible for the failure of MVA to induce tumor immunity through either cross presentation or direct infection of antigen presenting cells.

To detect and quantify tumor-antigen-specific CTL a method based on intracellular IFN-gamma staining was modified and it could be shown that the cellular – but not the humoral – response does correlate with *in vivo* protection: DNA but not MVA vaccines do induce high levels of tumorantigen-specific CTL whereas MVA-vaccines do induce strong and long lasting CD4 and CD8-T-cell responses against vaccinia antigens.

The excellent protection induced by pCI-DNA-vaccination in different tumor models does encourage us to further investigate the elicitation of tumor immunity in MUC1 or HLA-A2 transgenic mice. In mice transgenic for human MHC-I, the IFN-gamma staining protocol could be used to systematically screen for mucin T-cell epitopes that are relevant in humans.

From the results of the comparison of vaccines based on the vectors pCI and MVA and by analysing recent publications, one can conclude that DNA vaccines will play an important role in the development of tumor vaccines, whereas recombinant MVA viruses – in particular in combination with DNA or other vectors – have been shown to provide protection against infections induced by pathogens rather than inducing protective tumor immunity.

9 Literatur

Abbas, A.K., Cellular Immunology, 4th Edition, W. B. Saunders Company, Toronto, 2000

Anton, D., Dabadghao, K. (1998). Generation of Dendritic Cells from Peripheral Blood Adherent Cells in Medium with Human Serum. *Scan. J. Immunol.* 47, 116-121.

Acres, R. B., Hareuveni, M., Balloul, J. M., and Kieny, M. P. (1993). Vaccinia virus MUC1 immunization of mice: immune response and protection against the growth of murine tumors bearing the MUC1 antigen. *J Immunother* 14, 136-43.

Agrawal, B., Gendler, S. J., and Longenecker, B. M. (1998). The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Mol Med Today* 4, 397-403.

Aicher, A., Westermann, J., Cayeux, S., Willimsky, G., Daemen, K., Blankenstein, T., Uckert, W., Dorken, B., and Pezzutto, A. (1997). Successful retroviral mediated transduction of a reporter gene in human dendritic cells: feasibility of therapy with gene-modified antigen presenting cells. *Exp Hematol* 25, 39-44.

Akagi, J., Hodge, J. W., McLaughlin, J. P., Gritz, L., Mazzara, G., Kufe, D., Schlom, J., and Kantor, J. A. (1997). Therapeutic antitumor response after immunization with an admixture of recombinant vaccinia viruses expressing a modified MUC1 gene and the murine T-cell costimulatory molecule B7. *J Immunother* 20, 38-47.

Allen TM, Vogel TU, Fuller DH, Mothe BR, Steffen S, Boyson JE, Shipley T, Fuller J, Hanke T, Sette A, Altman JD, Moss B, McMichael AJ, Watkins DI. (2000). Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *J Immunol.* May 1;164(9):4968-78.

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

Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI, Montefiori DC, Xu Y, Herndon JG, Wyatt LS, Candido MA, Kozyr NL, Earl PL, Smith JM, Ma HL, Grimm BD, Hulse ML, Miller J, McClure HM, McNicholl JM, Moss B, Robinson HL. (2001). Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science.* Apr 6;292(5514):69-74.

Apostolopoulos, V., Osinski, C., and McKenzie, I. F. (1998). MUC1 cross-reactive Gal alpha(1,3)Gal antibodies in humans switch immune responses from cellular to humoral. *Nat Med* 4, 315-20.

Atkins, M. B. et al. (1999). High-dose recombinant interleukin-2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J. Clin. Oncol.* 17, 2105-2116

Bahloul, C., Jacob, Y., Tordo, N., and Perrin, P. (1998). DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine* 16, 417-25.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-52.

Barouch DH, Santra S, Kuroda MJ, Schmitz JE, Plishka R, Buckler-White A, Gaitan AE, Zin R, Nam JH, Wyatt LS, Lifton MA, Nickerson CE, Moss B, Montefiori DC, Hirsch VM, Letvin NL. (2001). Reduction of simian-human immunodeficiency virus 89.6P viremia in rhesus monkeys by recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccination. *J Virol.* Jun;75(11):5151-8.

Barouch DH, Santra S, Schmitz JE, Kuroda MJ, Fu TM, Wagner W, Bilka M, Craiu A, Zheng XX, Krivulka GR, Beaudry K, Lifton MA, Nickerson CE, Trigona WL, Punt K, Freed DC, Guan L, Dubey S, Casimiro D, Simon A, Davies ME, Chastain M, Strom TB, Gelman RS, Montefiori DC, Lewis MG, Emini EA, Shiver JW, Letvin NL. (2000). Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science.* Oct 20;290(5491):486-92.

Bernhardt, G., Bibb, J. A., Bradley, J., and Wimmer, E. (1994). Molecular characterization of the cellular receptor for poliovirus. *Virology* 199, 105-13.

Birmingham, K. (2001). Misconduct trouble brewing in Gottingen. *Nat Med* 7, 875

Brander, C., and Walker, B. D. (2000). Modulation of host immune responses by clinically relevant human DNA and RNA viruses. *Curr Opin Microbiol* 3, 379-86.

Brossart, P., Wirths, S., Stuhler, G., Reichardt, V. L., Kanz, L., and Brugger, W. (2000). Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96, 3102-8.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987): XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Bio-Techniques*, 5: 378.

Burnet, F. M. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1, 1171-1174 (1967).

Burnet, FM. (1970) The Concept of Immunological Surveillance. *Prog. Exp.Tumor Res.*13,1-23.

Carmon, L., El-Shami, K. M., Paz, A., Pascolo, S., Tzehoval, E., Tirosh, B., Koren, R., Feldman, M., Fridkin, M., Lemonnier, F. A., and Eisenbach, L. (2000). Novel breast-tumor-associated MUC1-derived peptides: characterization in Db-/- x beta2 microglobulin (beta2m) null mice transgenic for a chimeric HLA-A2.1/Db-beta2 microglobulin single chain. *Int J Cancer* 85, 391-7.

Carroll, M. W., Overwijk, W. W., Chamberlain, R. S., Rosenberg, S. A., Moss, B., and Restifo, N. P. (1997). Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a murine tumor model. *Vaccine* 15, 387-94.

Cayeux, S., Richter, G., Becker, C., Pezzutto, A., Dorken, B., and Blankenstein, T. (1999). Direct and indirect T cell priming by dendritic cell vaccines. *Eur J Immunol* 29, 225-34.

Cella, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9, 10-6.

- Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS. (1997). Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med.* Jun 26;336(26):1855-9.
- Chen CH, Wang TL, Ji H, Hung CF, Pardoll DM, Cheng WF, Ling M, Wu TC. (2001). Recombinant DNA vaccines protect against tumors that are resistant to recombinant vaccinia vaccines containing the same gene. *Gene Ther.* Jan;8(2):128-38.
- Coley WB. The therapeutic value of the mixed toxins of the streptococcus of erysipelas and bacillus prodigiosus in the treatment of inoperable malignant tumors: with a report of 160 cases. *Am J Med Sci.* 1896;112:251-281.
- Degano, P., Schneider, J., Hannan, C. M., Gilbert, S. C., and Hill, A. V. (1999). Gene gun intradermal DNA immunization followed by boosting with modified vaccinia virus Ankara: enhanced CD8+ T cell immunogenicity and protective efficacy in the influenza and malaria models. *Vaccine* 18, 623-32.
- Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., and Liu, M. A. (1997). DNA vaccines. *Life Sci* 60, 163-72.
- Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W., and Liu, M. A. (1997). DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 15, 617-48.
- Drexler I, Antunes E, Schmitz M, Wolfel T, Huber C, Erfle V, Rieber P, Theobald M, Sutter G. (1999). Modified vaccinia virus Ankara for delivery of human tyrosinase as melanoma-associated antigen: induction of tyrosinase- and melanoma-specific human leukocyte antigen A*0201-restricted cytotoxic T cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* Oct 1;59(19):4955-63.
- Engelmayer, J., Larsson, M., Subklewe, M., Chahroudi, A., Cox, W. I., Steinman, R. M., and Bhardwaj, N. (1999). Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* 163, 6762-8.
- Falk, K., Rotzschke, O., and Rammensee, H. G. (1992). A self peptide naturally presented by both H-2Kb and H-2Kbm1 molecules demonstrates MHC restriction of self tolerance at the molecular level. *Int Immunol* 4, 321-5.
- Fenner, F. (1989). Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res Virol* 140, 465-6; discussion 487-91.
- Fichtner I, Stein U, Hoffmann J, Winterfeld G, Pfeil D, Hentschel M. Characterization of four drug-resistant P388 sublines: resistance/sensitivity in vivo, resistance-and proliferation-markers, immunogenicity *Anticancer Res.* 1994 Sep-Oct;14(5A):1995-2003.
- Firat, H., Garcia-Pons, F., Tourdot, S., Pascolo, S., Scardino, A., Garcia, Z., Michel, M. L., Jack, R. W., Jung, G., Kosmatopoulos, K., Mateo, L., Suhrbier, A., Lemonnier, F. A., and Langlade-Demoyen, P. (1999). H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur J Immunol* 29, 3112-21.

Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG (2001). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 17;98(15):8809-14.

Foon KA, John WJ, Chakraborty M, Sherratt A, Garrison J, Flett M, Bhattacharya-Chatterjee M (1997). Clinical and immune responses in advanced colorectal cancer patients treated with anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine that mimics the carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res*. Aug;3(8):1267-76.

French RR, Chan HT, Tutt AL, Glennie MJ. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med*. 1999 May;5(5):548-53.

Fyfe, G. et al. (1995). Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high dose proleukin interleukin-2 therapy. *J. Clin. Oncol.* 13, 688-696

Gilbert, S. C., Schneider, J., Plebanski, M., Hannan, C. M., Blanchard, T. J., Smith, G. L., and Hill, A. V. (1999). Ty virus-like particles, DNA vaccines and Modified Vaccinia Virus Ankara; comparisons and combinations. *Biol Chem* 380, 299-303.

Gong, J., Chen, D., Kashiwaba, M., and Kufe, D. (1997). Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 3, 558-61.

Gong, J., Chen, D., Kashiwaba, M., Li, Y., Chen, L., Takeuchi, H., Qu, H., Rowse, G. J., Gendler, S. J., and Kufe, D. (1998). Reversal of tolerance to human MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice immunized with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6279-83.

Graham, R. A., Burchell, J. M., Beverley, P., and Taylor-Papadimitriou, J. (1996). Intramuscular immunisation with MUC1 cDNA can protect C57 mice challenged with MUC1-expressing syngeneic mouse tumour cells. *Int J Cancer* 65, 664-70.

Graham, R. A., Stewart, L.S., Beverley, P., and Taylor-Papadimitriou, J. (1995). Muc1 based immunogens for tumor therapy: development of murine model systems. *Tumor Targeting* 1, 211-221

de Grujil, T.D., Curiel D.T. (1999) Cancer vaccine strategies get bigger and better. *Nat Med*. 1999 Oct;5(10):1124-5

Hanke, T., and McMichael, A. (1999). Pre-clinical development of a multi-CTL epitope-based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS. *Immunol Lett* 66, 177-81.

Henderson, R. A., Konitsky, W. M., Barratt-Boyes, S. M., Soares, M., Robbins, P. D., and Finn, O. J. (1998). Retroviral expression of MUC-1 human tumor antigen with intact repeat structure and capacity to elicit immunity in vivo. *J Immunother* 21, 247-56.

Hodge, J. W. (1996). Carcinoembryonic antigen as a target for cancer vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 43, 127-34.

Hu, G. J., Wang, R. Y., Han, D. S., Alter, H. J., and Shih, J. W. (1999). Characterization of the humoral and cellular immune responses against hepatitis C virus core induced by DNA-based

immunization. *Vaccine* 17, 3160-70.

Huemer, H. P., Strobl, B., and Nowotny, N. (2000). Use of apathogenic vaccinia virus MVA expressing EHV-1 gC as basis of a combined recombinant MVA/DNA vaccination scheme. *Vaccine* 18, 1320-6.

Jantscheff, P., Bottger, V., Price, M., Micheel, B., Kaiser, G., Zotter, S., Kotzsch, M., Grossmann, H., and Karsten, U. (1991). Production and characterization of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen (CEA). *Biomed Biochim Acta* 50, 1261-7.

Jenne, L., Hauser, C., Arrighi, J. F., Saurat, J. H., and Hugin, A. W. (2000). Poxvirus as a vector to transduce human dendritic cells for immunotherapy: abortive infection but reduced APC function. *Gene Ther* 7, 1575-83.

Jenne, L., Schuler, G., and Steinkasserer, A. (2001). Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy. *Trends Immunol* 22, 102-7.

Kaplan, J. M., Yu, Q., Piraino, S. T., Pennington, S. E., Shankara, S., Woodworth, L. A., and Roberts, B. L. (1999). Induction of antitumor immunity with dendritic cells transduced with adenovirus vector-encoding endogenous tumor-associated antigens. *J Immunol* 163, 699-707.

Karsten, U., Diotel, C., Klich, G., Paulsen, H., Goletz, S., Muller, S., and Hanisch, F. G. (1998). Enhanced binding of antibodies to the DTR motif of MUC1 tandem repeat peptide is mediated by site-specific glycosylation. *Cancer Res* 58, 2541-9.

Keene, J. A., and Forman, J. (1982). Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 155, 768-82.

Kern, F., Sural, I. P., Brock, C., Freistedt, B., Radtke, H., Scheffold, A., Blasczyk, R., Reinke, P., Schneider-Mergener, J., Radbruch, A., Walden, P., and Volk, H. D. (1998). T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat Med* 4, 975-8.

Klein, E. and Sjorgren, H.O. (1960) Humoral and cellular factors to homograft and isograft immunity. *Cancer Res.* 20, 452 (1960)

Kowalczyk, D. W., Wlazlo, A. P., Giles-Davis, W., and Ertl, H. C. (2000). Staining of antigen activated lymphocytes (SAAL): a highly specific method for flow cytometric quantitation of tumor-specific CD8(+) T cells. *J Immunol Methods* 241, 131-9.

Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zoller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Muller, C. A., Becker, V., Gross, A. J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Muller, G. A., and Ringert, R. H. (2000). Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 6, 332-6.

Kwissa, M., von Kampen v, K., Zurbriggen, R., Gluck, R., Reimann, J., and Schirmbeck, R. (2000). Efficient vaccination by intradermal or intramuscular inoculation of plasmid DNA expressing hepatitis B surface antigen under desmin promoter/enhancer control. *Vaccine* 18, 2337-44.

Lane, P., C. Burdet, F. McConnell, A. Lanzavecchia, and E. Padovan. 1995. CD40 ligand-

independent B cell activation revealed by CD40 ligand- deficient T cell clones: evidence for distinct activation requirements for antibody formation and B cell proliferation. *Eur J Immunol.* 25:1788-93.

Lanzavecchia, A. (1998). Immunology. Licence to kill. *Nature* 393, 413-4.

Larsson, M., Fonteneau, J. F., and Bhardwaj, N. (2001). Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol* 22, 141-8.

Lorenz, M. G., Kantor, J. A., Schlom, J., and Hodge, J. W. (1999). Anti-tumor immunity elicited by a recombinant vaccinia virus expressing CD70 (CD27L). *Hum Gene Ther* 10, 1095-103.

Lotze, M. T., Line, B. R., Mathisen, D. J., and Rosenberg, S. A. (1980). The in vivo distribution of autologous human and murine lymphoid cells grown in T cell growth factor (TCGF): implications for the adoptive immunotherapy of tumors. *J Immunol* 125, 1487-93.

Lowrie, D.B., *DNA Vaccines - Methods and Protocols*, Humana Press, New Jersey, 2000

Mayr, A., Stickl, H., Muller, H. K., Danner, K., and Singer, H. (1978). [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [B]* 167, 375-90.

McShane H, Brookes R, Gilbert SC, Hill AV. (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.* Feb;69(2):681-6.

Meden H, Beneke A, Hesse T, Novophashenny I, Wischnewsky M. (2001) Weekly intravenous recombinant humanized anti-P185HER2 monoclonal antibody (herceptin) plus docetaxel in patients with metastatic breast cancer: a pilot study. *Anticancer Res.* 21 (2B):1301-5.

Men R, Wyatt L, Tokimatsu I, Arakaki S, Shameem G, Elkins R, Chanock R, Moss B, Lai CJ. (2000). Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine.* Jul 15;18(27):3113-22.

Micheel, B. (1998), Tumorantigene und ihre Nutzung für eine Therapie mit Antikörpern. In: *Handbuch der Molekularen Medizin*, Band 2, Herausgeber: D. Ganten und K. Ruckpaul, Springer Verlag Berlin Heidelberg 1998

Moskowitz, M. O., Byrne, D. S., Callahan, H. J., Parsons, C. L., Valderrama, E., and Moldwin, R. M. (1994). Decreased expression of a glycoprotein component of bladder surface mucin (GP1) in interstitial cystitis. *J Urol* 151, 343-5.

Morse MA, Deng Y, Coleman D, Hull S, Kitrell-Fisher E, Nair S, Schlom J, Ryback ME, Lysterly HK (1999). A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res.* Jun;5(6):1331-8.

- Moss, B. et al., in: Current Protocols in Molecular Biology, Band IV, Kapitel 16.15: Overview of the Vaccinia Virus Expression System. New York (1998)
- Niethammer AG, Primus FJ, Xiang R, Dolman CS, Ruehlmann JM, Ba Y, Gillies SD, Reisfeld RA. (2001). An oral DNA vaccine against human carcinoembryonic antigen (CEA) prevents growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in CEA transgenic mice. *Vaccine*. 2001 Nov 12;20(3-4):421-9.
- Nilsson C, Makitalo B, Berglund P, Bex F, Liljestrom P, Sutter G, Erfle V, ten Haaf P, Heeney J, Biberfeld G, Thorstensson R. (2001). Enhanced simian immunodeficiency virus-specific immune responses in macaques induced by priming with recombinant Semliki Forest virus and boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Vaccine*. May 14;19(25-26):3526-36.
- Old, L.J. Clarke, D.A. and Boyse, E.A. Antigenic properties of chemically induced tumors. *Ann. NY Acad. Science*. 101, 80 (1962)
- Pardoll, D. M., and Beckerleg, A. M. (1995). Exposing the immunology of naked DNA vaccines. *Immunity* 3, 165-9.
- Pecher, G., and Finn, O. J. (1996). Induction of cellular immunity in chimpanzees to human tumor-associated antigen mucin by vaccination with MUC-1 cDNA-transfected Epstein-Barr virus-immortalized autologous B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1699-704.
- Pelegri, A., Terskikh, A., Hayoz, D., Chalandon, Y., Olsson, N. O., Folli, S., Buchegger, F., Kromer, B., Schwarz, K., Martin, M., and et al. (1992). Human carcinoembryonic antigen cDNA expressed in rat carcinoma cells can function as target antigen for tumor localization of antibodies in nude rats and as rejection antigen in syngeneic rats. *Int J Cancer* 52, 110-9.
- Pietersz, G. A., Li, W., Osinski, C., Apostolopoulos, V., and McKenzie, I. F. (2000). Definition of MHC-restricted CTL epitopes from non-variable number of tandem repeat sequence of MUC1. *Vaccine* 18, 2059-71.
- Prehn R and JM Main (1957). Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 18:769-778
- Ramirez, J. C., Gherardi, M. M., and Esteban, M. (2000). Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J Virol* 74, 923-33.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T- helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-8.
- Riethmuller G., Schneider-Gadicke E., Johnson J.P. (1993) Monoclonal antibodies in cancer therapy *Curr Opin Immunol*. Oct;5(5):732-9.
- Riethmuller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayr R, et al. (1994) Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. *Lancet*. 343(8907):1177-83.

Romagnani, S. (1995). Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol* 15, 121-9.

Romero, P., Cerottini, J. C., and Waanders, G. A. (1998). Novel methods to monitor antigen-specific cytotoxic T-cell responses in cancer immunotherapy. *Mol Med Today* 4, 305-12.

Rosales C, Graham VV, Rosas GA, Merchant H, Rosales R. (2000). A recombinant vaccinia virus containing the papilloma E2 protein promotes tumor regression by stimulating macrophage antibody-dependent cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother.* Sep;49(7):347-60.

Rosenberg, S. A. (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, 380-4.

Rosenberg, S.A., White D.E. 1996. Vitiligo in patients with melanoma: Normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy, *Journal of Immunotherapy* 19 (1): 81-84

Rosenberg, S. A. et al. (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 313, 1485-1492.

Rosenberg, S. A., Yang, J. C., White, D. E. & Steinberg, S. M. (1998). Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2. *Ann. Surg.* 228, 307-319

Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. (1998) Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med.* 4(3):321-7.

Roth, C., Rochlitz, C., Kouilsky, P. (1994). Immune response against tumors. *Adv Immunol.* 57:281-351

Scheinberg, D.A. (1991). Current applications of monoclonal antibodies for the therapy of hematopoietic cancers *Curr Opin Immunol.* Oct;3(5):679-84.

Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K. J., Hannan, C. M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G. L., and Hill, A. V. (1998). Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 4, 397-402.

Schneider J, Langermans JA, Gilbert SC, Blanchard TJ, Twigg S, Naitza S, Hannan CM, Aidoo M, Crisanti A, Robson KJ, Smith GL, Hill AV, Thomas AW. (2001). A prime-boost immunisation regimen using DNA followed by recombinant modified vaccinia virus Ankara induces strong cellular immune responses against the Plasmodium falciparum TRAP antigen in chimpanzees. *Vaccine.* Sep 14;19(32):4595-602.

Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., and Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-3.

Seth A, Ourmanov I, Schmitz JE, Kuroda MJ, Lifton MA, Nickerson CE, Wyatt L, Carroll M, Moss B,

- Venzon D, Letvin NL, Hirsch VM. (2000). Immunization with a modified vaccinia virus expressing simian immunodeficiency virus (SIV) Gag-Pol primes for an anamnestic Gag-specific cytotoxic T-lymphocyte response and is associated with reduction of viremia after SIV challenge. *J Virol.* Mar;74(6):2502-9.
- Seth A, Ourmanov I, Kuroda MJ, Schmitz JE, Carroll MW, Wyatt LS, Moss B, Forman MA, Hirsch VM, Letvin NL. (1998). Recombinant modified vaccinia virus Ankara-simian immunodeficiency virus gag pol elicits cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys detected by a major histocompatibility complex class I/peptide tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 18;95(17):10112-6.
- Scholl, S. M., Balloul, J. M., Le Goc, G., Bizouarne, N., Schatz, C., Kieny, M. P., von Mensdorff-Pouilly, S., Vincent-Salomon, A., Deneux, L., Tartour, E., Fridman, W., Pouillart, P., and Acres, B. (2000). Recombinant vaccinia virus encoding human MUC1 and IL2 as immunotherapy in patients with breast cancer. *J Immunother* 23, 570-80.
- Sharpe S, Polyanskaya N, Dennis M, Sutter G, Hanke T, Erfle V, Hirsch V, Cranage M. (2001). Induction of simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CTL in rhesus macaques by vaccination with modified vaccinia virus Ankara expressing SIV transgenes: influence of pre-existing anti-vector immunity. *J Gen Virol.* Sep;82(Pt 9):2215-23.
- Shirai, M., Arichi, T., Nishioka, M., Nomura, T., Ikeda, K., Kawanishi, K., Engelhard, V. H., Feinstone, S. M., and Berzofsky, J. A. (1995). CTL responses of HLA-A2.1-transgenic mice specific for hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of humans carrying HLA-A2.1. *J Immunol* 154, 2733-42.
- Smyth, M. Godfrey, D.I., Trapani, J.A. (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and Immunotherapy. *Nature Immunology* 2, 293 - 299
- Srivastava, P. K. (2000). Immunotherapy of human cancer: lessons from mice. *Nat Immunol* 1, 363-6.
- Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-96.
- Stittelaar KJ, Wyatt LS, de Swart RL, Vos HW, Groen J, van Amerongen G, van Binnendijk RS, Rozenblatt S, Moss B, Osterhaus AD. (2000). Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus Ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies. *J Virol.* May;74(9):4236-43.
- Sutter, G., Wyatt, L. S., Foley, P. L., Bennink, J. R., and Moss, B. (1994). A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine* 12, 1032-40.
- Tamura, Y., Peng, P., Liu, K., Daou, M., and Srivastava, P. K. (1997). Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* 278, 117-20.
- Tempero, R.M., VanLith, M.L., Hollingsworth, M.A. (1998). CD4+ Lymphocytes Provide MUC1-Specific Tumor Immunity In Vivo That Is Undetectable In Vitro and Is Absent in MUC1 transgenic mice. *J. Immunol.* 7/98 5500-06

Thompson, J. A., Grunert, F., and Zimmermann, W. (1991). Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 5, 344-66.

Thopalian, S.L. (2001) Tumor Immunology - Editorial Overview. *Curr. Op. Immunol.* 13, 131-133

Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, Zhu MZ, Hamilton JM, Schlom J (1995). Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J Natl Cancer Inst.* Jul 5;87(13):982-90.

Ureta-Vidal, A., Firat, H., Perarnau, B., and Lemonnier, F. A. (1999). Phenotypical and functional characterization of the CD8+ T cell repertoire of HLA-A2.1 transgenic, H-2KbnullDbnull double knockout mice. *J Immunol* 163, 2555-60.

Valdez Graham V, Sutter G, Jose MV, Garcia-Carranca A, Erfle V, Moreno Mendoza N, Merchant H, Rosales R. (2000). Human tumor growth is inhibited by a vaccinia virus carrying the E2 gene of bovine papillomavirus. *Cancer.* 2000 Apr 1;88(7):1650-62.

Vieira, J. and Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19: 259-68

Watts, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15, 821-50.

Weidinger G, Ohlmann M, Schlereth B, Sutter G, Niewiesk S. (2001). Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara protects against measles virus infection in the mouse and cotton rat model. *Vaccine.* Apr 6;19(20-22):2764-8.

Wentworth, P. A., Vitiello, A., Sidney, J., Keogh, E., Chesnut, R. W., Grey, H., and Sette, A. (1996). Differences and similarities in the A2.1-restricted cytotoxic T cell repertoire in humans and human leukocyte antigen-transgenic mice. *Eur J Immunol* 26, 97-101.

Wild, J., Grusby, M. J., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (1999). Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. *J Immunol* 163, 1880-7.

Wolff, J. A., Ludtke, J. J., Acsadi, G., Williams, P., and Jani, A. (1992). Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1, 363-9.

Wong, C., Morse, M., and Nair, S. K. (1998). Induction of primary, human antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using dendritic cells pulsed with peptides. *J Immunother* 21, 32-40.

Yee, C., Riddell, S.R., Greenberg, P.D. (2001). In vivo tracking of tumor-specific T-cells. *Curr. Op. Immunol.*, 13, 141-148

10 Abkürzungsverzeichnis

Alanin	A / Ala
Arginin	R / Arg
Asparaginsäure	D / Asp
Cystein	C / Cys
Glutaminsäure	E / Glu
Glutamin	Q / Gln
Glycin	G / Gly
Histidin	H / His
Isoleucin	I / Ile
Leucin	L / Leu
Lysin	K / Lys
Methionin	M / Met
Phenylalanin	F / Phe
Prolin	P / Pro
Serin	S / Ser
Threonin	T / Thr
Tryptophan	T / Trp
Tyrosin	Y / Tyr
Valin	V / Val
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μF	Mikro-Farrad
aa	amino acid - Aminosäure
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APC	professionelle Antigenpräsentierende Zelle
BHK	<i>baby hamster kidney cells</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i> - Rinderserumalbumin
C (-Terminus)	Carboxy-Terminus
CD	<i>cluster of differenciation</i> , Differenzierungscluster
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CT	<i>cytoplomatic tail</i> – intrazelluläre Domäne
CTL	zytotoxische T-Zelle(n)
Da	Dalton

DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco´s modified eagle´s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein Barr Virus
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISPOT	<i>enzyme linked immunospot assay</i>
FACS	fluorescence-activated cell scanner
FCS	fötales Rinderserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G418	Geneticinsulfat
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte / macrophage-colony stimulating factor</i>
h	Stunde(n)
HBSS	Hank´s balanced salt solution
HEBS	HEPES bufferd saline
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethan-Sulfonsäure
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen (= humanes MHC)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
Kb bzw. Kd	MHC-I Molekül in C57BL/6-Mäusen
kDa	Kilodalton
KV	Kilovolt
LacZ	Gen für E.coli beta-Galactosidase
LAK	<i>lymphokine activated killer cell</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mAB	monoclonal Antibody
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mock	“Schein”, Kontrollgruppe
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	messenger RNA
MUC1	Mucin1 (Gen)
N (-Terminus)	Aminoterminus
ng	Nanogramm

NK	natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	R-Phycoerythrin
PFU	<i>plaque forming unit</i>
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswells Park memorial Institute (Medium)
RT	Raumtemperatur
β2MG	beta-2-Mikroglobulin
TBE	Tris/Borat/EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-teramethylethylendiamin
Th	T-Helferzelle
TM	Transmembrandomaine
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
U	Unit - Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VNTR	<i>variable number tandem repeats</i>
Vol	Volumen
X-Gal	5-bromo-4-chlor-3-indolyl-b-D-galactoside

11 Danksagung

Bei den zahlreichen Personen, die diese Arbeit durch ihren Einsatz und ihre Unterstützung ermöglicht haben, möchte ich mich herzlich bedanken, insbesondere bei:

Herrn Prof. Micheel für die Übernahme der Betreuung

Dr. Gabriele Pecher für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und den intensiven Einsatz bei der Korrektur

Dr. Martin Lipp für die Bereitstellung der sehr guten Arbeitsbedingungen

Dr. Günter Bernhardt für seine Hilfe bei molekularbiologischen und virologischen Techniken und die Hilfe bei der Korrektur

Dr. Uta Höpken und Dr. Felix Cifire für die sehr zeitaufwendige Hilfe bei den Mausexperimenten

Dagmar Breitfeld für die exzellente, regelmäßige technische Unterstützung und den täglichen psychischen Beistand

Dr. Gerd Müller für die Hilfestellungen im Kampf mit Betriebssystemen und Software und für die Korrektur

Dr. Reinhold Förster für seine exzellente Hilfe in allem immunologischen Fragestellungen und der FACS-Analyse

Mariette Mohaupt und Sophie Cayeux für ihre Hilfe in DC-Biologie und für die Tumorzellen

Dr. Christian Ried - weil er immer so besorgt war ob es mir auch gut geht und weil es immer jemand gab, der noch schlechtere Ergebnisse hatte als ich

Hagen Kulbe für die Kooperation und das regelmäßige *primen* und *boosten*

allen Kollegen: Thomas Schirmann, Thilo Mokros, Dagmar Meyer, Frank Jeblonski, Peter Grashoff, Robert Lange, Markus Gräler, Gabor Kaba, Thilo Mokros, Lars Ohl, Venjamin Pevzner, Steffen Posner, Philipp Reiterer, Angelika Weiss, Daniela Keyner, Arndt Häring, Mike Ziegner und Ulf Hanack.

12 Lebenslauf

Name:	Heiko Johnen	
Geburtsdatum:	4. Juni 1969	
Geburtsort:	Stuttgart	
Schulbildung:	1975 – 1979:	Grundschule Sinzig
	1979 – 1988:	Rheingymnasim Sinzig
	6/88:	Abitur am Rheingymnasium Sinzig
Zivildienst:	2/89 – 9/90:	Lebenshilfe Bonn
Studium:	10/90 – 10/92:	Grundstudium in Biologie (und Vordiplom) an der Univ. Bonn
	11/92 – 06/94:	Grundstudium in Biochemie (und Vordiplom) an der Univ. Tübingen
	07/94 – 07/95:	Austauschstudent an der San Francisco State University als "study abroad" Stipendiat der Univ. Tübingen
	08/95 – 12/98:	Hauptstudium in Biochemie und Molekularbiologie an der Universität Hamburg Diplomarbeit am Bernhardt-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, unter Anleitung von Prof. Dr. B. Fleischer Thema: Entwicklung von Methoden zur Detektion von Polymorphismen im HIV-Korezeptor CCR5, die zur HIV-Resistenz beitragen.
	04/98 – 06/01:	Doktorarbeit am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin mit dem Thema: „Vergleich von Vektoren auf der Basis von DNA und modifiziert vaccinia virus Ankara (MVA) zur Tumorummuntherapie im C57BL/6 Mausmodell“

13 Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die an der Universität Potsdam eingereichte Dissertation zum Thema „Vergleich von rekombinanten Vaccinia- und DNA-Vektoren zur Tumorummuntherapie im C57BL/6-Mausmodell“ am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin, und der Charité der Humboldt-Universität, Berlin, selbständig durchgeführt habe. Die Arbeit wurde in den Arbeitsgruppen von PD Dr. Martin Lipp und Dr. G. Pecher im Zeitraum von April 1998 bis Juni 2001 angefertigt und im Juni 2001 an der Universität Potsdam eingereicht. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Berlin, den 4.6.2001

Heiko Johnen

Unterstützt wurde die vorliegende Arbeit teilweise durch ein Promotionsstipendium der Humboldt-Universität, Berlin.

14 Publikationen

Teile dieser Arbeit sind publiziert in:

Johnen H, Kulbe H, Pecher G. (2001). Long-term tumor growth suppression in mice immunized with naked DNA of the human tumor antigen mucin (MUC1). *Cancer Immunol Immunother.* Sep;50(7):356-60.

Vorträge:

Joint Annual Meeting of Immunology in Düsseldorf, Dezember 2000

Novel Strategies for Vaccination and Immunotherapy

Abstract P.24

Naked DNA immunization leads to effective protection from tumors expressing the human tumor antigens mucin (MUC1) and the carcinoembryonic antigen (CEA) in a mouse model

(H. Johnen, H. Kulbe, M. Lipp, and G. Pecher)

<http://www.uni-duesseldorf.de/dgfi2000/abstract/p24.htm>

eingereichte Publikationen:

CD40-activated P388 tumor cells used as vaccine inhibit tumor growth in mice

Heiko Johnen, Gabriele Pecher

Evaluation of the immune response elicited by different vaccines for immunotherapy through quantitative determination of antigen specific cytotoxic lymphocytes by intracellular Interferon-gamma staining

Heiko Johnen and Gabriele Pecher

weitere Publikationen:

The second messenger binding site of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase is centered in the catalytic domain and related to the inositol trisphosphate receptor site. Bertsch U, Deschermeier C, Fanick W, Girkontaite I, Hillemeier K, Johnen H, Weglohner W, Emmrich F, Mayr GW. *J Biol Chem.* 2000 Jan 21;275(3):1557-64.

15 Anhang

Die Sequenzierung der *multiple cloning site* des Transfervektors puc2LZp75#14 ergab folgende Sequenz:

```
5'GAACAGTGACGGATCCCCGGAAATTGGGGATCTGGGGGATCCCCCTGCCCGGTT
ATTATTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGGTAGCGACCGGCGCTCAGCTGGA
ATTCCGCCGATACTGAC3'
```

Dabei ist zu beachten, daß die Sequenz nicht vollständig der vom Hersteller angegebenen Sequenz entsprach (unten). Offensichtlich ist eine BamH-I-Schnittstelle unmittelbar vor der markierten Sma-I Klonierungsstelle (CCCCGGG) eingeführt worden (GGATCC) während einige andere Nucleotide fehlen. Anhand der vom Hersteller angegebenen Sequenz (unten) ist der Sequenzierprimer entwickelt worden (unterstrichen).

```
5'-
TCTCGAAAAGTAGAAAATATATTCTAATTTATTGCACGGTAAGGAAGTAGAATCATAAA
GGAACAGGGGACGGGTCCCCGGAAATTGGGGGGGATCTGGGGGATCCCCCTGCC
CGGTTATTATTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGGTAGCGACCGGCGCTCAG
CTGGAATTCCGCCGATACTGAC3'
```

Sequenz von puc2LZp75#14-MUC1:

Die lesbare Sequenz (5'>3') beginnt unmittelbar hinter dem ATG-Codon. Durch eine eingeführte Not-I-Schnittstelle (markiert) entsprechen die ersten sechs Aminosäuren nicht dem Genbank-Eintrag

```
GGGGGAATTC TCGCGGCCGC GTCTCCTTTC TTCCTGCTGC TGCTCCTCAC AGTGCTTACA
GTTGTTACAG GTTCTGGTCA TGCAAGCTCT ACCCCAGGTG GAGAAAAGGA GACTTCGGCT
ACCCAGAGAA GTTCAGTGCC CAGCTCTACT GAGAAGAATG CTGTGAGTAT GACCAGCAGC
GTACTCTCCA GCCACAGCCC CGGTTCAGGC TCCTCCACCA CTCAGGGACA GGATGTCACT
CHRRCCCCGG CCACGGAACC AGCTTCAGGT TCAGCTGCCA CCTGGGGACA GGATGTCACC
TCGGTCCCAG TCACCAGGCC AGCCCTGGAC
```

Sequenz von puc2LZp75#14-CEA: Die ersten drei CCC entsprechen der verwendeten Sma-I-Schnittstelle des Vektors Zwischen ATG-Startcodon (markiert) und der Sma-I-Klonierungsstelle liegt ein kurzes Stück genomische DNA

```
CCCAATTCCC GGGGTCACAG CAGCCTTGAC AAAACGTTCC TGGAACTCAA GCTCTTCTCC
ACAGAGGAGG ACAGAGCAGA CAGCAGAAAC CATGGAGTCT CCCTCGGCCC CTCCCCACAG
ATGGTGCATC CCCTGGCAGA GGCTCCTGCT CACAGCCTCA CTTCTAACCT TCTGGAACCC
GCCACCACT GCCAAGCTCA CTATTGAATC CACGCCGTTT AATGTCGCAG AGGGGAAGGA
GGTGCTTCTA CTTGTCCACA ATCTGCCCCA GCATCTTTTT GGCTACAGCT GGTACAAAGG
TGAAAGAGTG GATGGCAACC GTCAAATTAT AGGATATGTA ATAGGAACTC AACAAGCTAC
CCCAGGGCCC GCATACAGTG GTCGAGAGAT AATATACCCC AATGCATCCC GCTGATCCAG
```