

**Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie  
und Onkologie am Campus Virchow Klinikum  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin**

**DISSERTATION**

**FIt-3L als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung**

**Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

**von**

**Andreas Mollweide**

**aus Singen**

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J. Westermann

2. Priv.-Doz. Dr. med. G. Massenkeil

3. Prof. Dr. Dr. habil. S. Burdach

Datum der Promotion: 19.03.2010

Meinen Eltern Rita und Peter Mollweide

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich auf meinem wissenschaftlichen Weg begleitet haben.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Jörg Westermann für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung der Arbeit und die uneingeschränkte Unterstützung bedanken, die die erfolgreiche Durchführung der Arbeit erst möglich machte. Die interessanten Diskussionen und wertvollen Anregungen lieferten stets Ideen für neue Experimente.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Antonio Pezzutto für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die konstruktive Kritik bedanken, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pezzutto für die nette Atmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken. Das Arbeitsklima war stets von breitem wissenschaftlichen Austausch und freundschaftlichem Umgang geprägt.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. Tam Nguyen-Hoai für die Unterstützung bei einigen Versuchen und die Fortführung der Thematik.

Bei Herrn Dr. Günther Richter bedanke ich mich für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und die gute Kooperation über meine Zeit in der AG Pezzutto hinaus. Für die praktische Unterstützung möchte ich mich besonders bei Kerstin Daemen bedanken.

Meinen Freunden und Bekannten danke ich für ihren ganz persönlichen Beitrag zum Gelingen der Arbeit. Veit Hofmann danke ich für seine freundschaftliche Begleitung auf meinem Berufsweg, der diesen damit maßgeblich mitprägte. Meiner Freundin Ute danke ich, dass sie mich im Entstehungsprozess der Arbeit mit Liebe und Geduld unterstützt hat.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für ihre beständige und liebevolle Unterstützung.

# Inhalt

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
1.1 IMMUNTHERAPIE.....	3
1.2 DENDRITISCHE ZELLEN .....	7
1.2.1 Antigenaufnahme und -prozessierung.....	7
1.2.2 Reifung und Migration.....	8
1.2.3 Subtypen von dendritischen Zellen.....	9
1.2.3.1 Murine DCs.....	11
1.2.3.2 Humane DCs.....	13
1.2.4 DC-Subtypen und Induktion von T-Zell-Immunität.....	15
1.2.4.1 Murine DC-Subtypen.....	15
1.2.4.2 Humane DC-Subtypen.....	15
1.3 TUMORVAKZINIERUNG MIT DC-BASIERTEN ZELLULARTHERAPEUTIKA.....	17
1.4 DNA-VAKZINIERUNG.....	19
1.4.1 Immunantwort nach DNA-Vakzinierung.....	19
1.4.2 Applikationswege.....	21
1.4.3 Verbesserung der Immunantwort nach DNA-Vakzinierung.....	22
1.4.4 $\beta$ -Galactosidase-Modellsystem .....	24
1.5 FLT3-LIGAND .....	25
1.5.1 Hämatopoetische Effekte von Flt-3L.....	25
1.5.2 Immunologische Effekte von Flt-3L.....	26
1.5.3 Klinische Studien mit Flt-3L.....	26
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	27
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>28</b>
2.1 MATERIAL .....	28
2.1.1 Chemikalien .....	28
2.1.2 Puffer.....	29
2.1.3 Antikörper.....	31
2.1.4 Proteine, Peptide und Enzyme .....	32
2.1.5 Geräte und Material für die Molekularbiologie und Biochemie.....	32
2.1.6 Medien für die prokaryontische Zellkultur.....	33
2.1.7 Plasmide.....	33
2.1.8 Bakterienstämme.....	34
2.1.9 Geräte und Material für die Zellkultur.....	34
2.1.10 Material für immunologische Methoden.....	35
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	38

2.2.1 Bakterienkultur.....	38
2.2.2 Transformation von Bakterien .....	38
2.2.3 Anlegen von Glycerolkulturen.....	39
2.2.4 Plasmidpräparationen.....	39
2.2.5 Konzentrationsbestimmung von RNA- und DNA-Lösungen.....	40
2.2.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	40
2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	41
2.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	42
2.3.1 Zelllinien .....	42
2.3.1.1 MC-57.....	42
2.3.1.2 MCA-205 .....	42
2.3.2 Zellkultur.....	42
2.3.3 Zellpassage.....	42
2.3.4 Einfrieren von Zellen.....	43
2.3.5 Auftauen von Zellen.....	43
2.3.6 Zellzahlbestimmung.....	43
2.4 IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	44
2.4.1 Immunisierung von C57/BL6-Mäusen.....	44
2.4.2 Präparation von Splenozyten .....	44
2.4.3 Präparation von Dendritischen Zellen.....	45
2.4.3.1 Präparation von DCs aus Splenozyten .....	45
2.4.3.2 Präparation von DCs aus Knochenmark.....	45
2.4.4 FACS-Analyse .....	46
2.4.5 Fluoreszenzfärbung der Zellen.....	47
2.4.6 IFN- $\gamma$ -Sekretionsassay .....	47
2.4.7 Proliferationsassay .....	49
2.4.8 Chromium-Release-Assay .....	49
2.4.9 Immunhistochemie.....	50
2.4.10 ELISA .....	51
2.4.10.1 ELISA auf IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3-Serum-Antikörper .....	51
2.4.10.2 ELISA auf IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 und $\gamma$ -IFN-Sekretion.....	52
2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	53
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>54</b>
3.1 EXPANSION DENDRITISCHER ZELLEN MIT FLT-3L IN VIVO.....	54
3.1.1 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung der Milzen .....	54
3.1.2 In-Vivo-Applikation von Flt-3L.....	55
3.2 EINFLUSS VON FLT-3L AUF DIE IMMUNANTWORT IN VIVO.....	57
3.2.1 Optimierung der DNA-Vakzinierung und des Proliferationsassays.....	58
3.2.2 Einfluss von Flt-3L auf die proliferative Immunantwort nach DNA-Vakzinierung.....	61
3.2.3 Einfluss von Flt-3L auf die zytotoxische Immunantwort .....	64

3.2.4 $\beta$ -Galactosidase-spezifische T-Zellen nach DNA-Vakzinierung .....	65
3.2.5 Einfluss von Flt-3L auf die humorale Immunantwort .....	68
3.2.6 Einfluss von Flt-3L auf das Zytokinprofil von Splenozyten.....	69
3.3 REIFEZUSTAND DER FLT-3L-INDUZIERTEN DENDRITISCHEN ZELLEN .....	71
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
<b>5 REFERENZEN.....</b>	<b>83</b>

## **Zusammenfassung**

Die genetische Immunisierung mittels Plasmid-DNA (DNA-Vakzinierung) ist eine einfach durchzuführende Methode, um in vivo eine Antigen-spezifische Immunantwort zu induzieren. Die DNA-Vakzinierung bietet im Hinblick auf die Tumorstimmulierung mehrere Vorteile: Expression multipler CD4- und CD8-T-Zellepitope, Immunogenität von DNA durch CpG-Sequenzen und die Möglichkeit der Applikation als „universelle Vakzine“ über HLA-Barrieren hinaus. DNA-Vakzine induzieren sowohl eine Antikörper- als auch eine T-Zell-vermittelte Immunantwort, jedoch ist die zytotoxische Immunantwort beim Menschen meist nicht effizient genug, um eine Tumorstimmulierung herbeizuführen. Eine Verbesserung der durch DNA-Vakzine induzierten Immunantwort ist eine Voraussetzung für einen erfolgreichen Einsatz in der Immuntherapie, der Einsatz in der klinischen Situation einer „Minimalen Resttumorkrankung“ (MRD, „minimal residual disease“) erscheint besonders erfolgversprechend.

Flt3-Ligand (Flt-3L) ist ein 1991 entdecktes Zytokin, das in vivo die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen, insbesondere dendritischen Zellen, stimuliert. Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion und T<sub>H</sub>-Polarisierung der Immunantwort.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Flt-3L auf die Immunantwort nach DNA-Vakzinierung, insbesondere die Modifikation der T-Zell-vermittelten Immunantwort.

In der Maus führte die Applikation von rekombinantem Flt-3L zu einer Expansion von myeloischen und lymphoiden dendritischen Zellen: In den Milzen Flt-3L-behandelter Mäuse konnte ein drei- bis vierfacher Anstieg der Anzahl von dendritischen Zellen beobachtet werden.

Zur Untersuchung des (adjuvanten) Effektes von Flt-3L auf die Immunantwort nach DNA-Vakzinierung wurden C57/BL6-Mäuse mit einem für bakterielle  $\beta$ -Galactosidase kodierenden Plasmid intramuskulär immunisiert.  $\beta$ -Galactosidase diente als gut charakterisiertes Modellantigen, für das immunogene MHC-restringierte Peptide bekannt sind. Die Mäuse erhielten täglich 10  $\mu$ g rekombinantes Flt-3L über einen Zeitraum von 12 Tagen subkutan appliziert, am siebten Tag wurden die Mäuse intramuskulär mit dem für  $\beta$ -Galactosidase kodierenden Plasmid vakziniert.

Die Behandlung der Mäuse mit Flt-3L resultierte in einer signifikanten Steigerung der Antigen-spezifischen proliferativen Immunantwort bei In-Vitro-Restimulation der Splenozyten.

Die Analyse des Zytokinprofils der restimulierten Splenozyten zeigte, dass die Applikation von Flt-3L nicht zu einer T<sub>H</sub>1-Polarisierung der Immunantwort führte. Ganz im Gegenteil fand sich eine Tendenz zu einer T<sub>H</sub>2-Polarisierung der Immunantwort, passend hierzu war auch die humorale Immunantwort vorwiegend durch IgG1-Antikörper geprägt. Eine zytotoxische T-Zell-Antwort der restimulierten Splenozyten von Flt-3L-behandelten Mäusen gegen  $\beta$ -Galactosidase-Peptid-gepulste Targetzellen konnte nicht beobachtet werden. Um die Ursache der fehlenden T<sub>H</sub>1-Polarisierung zu klären, wurden die expandierten dendritischen Zellen genauer charakterisiert. Es zeigte sich, dass die dendritischen Zellen einen unreifen Phänotyp aufwiesen, welcher mit einer fehlenden bzw. geringen Expression der akzessorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 einherging.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Flt-3L als Adjuvans einer DNA-Vakzinierung zwar in der Lage ist, eine Immunantwort zu verstärken, jedoch nicht per se zu einer T<sub>H</sub>1-Polarisierung führt.

Der Phänotyp der mittels Flt-3L expandierten dendritischen Zellen lässt vermuten, dass dies möglicherweise auf eine fehlende Ausreifung zurückzuführen ist. Darum ist anzunehmen, dass die alleinige Applikation von Flt-3L als Adjuvans im Rahmen der Tumorstimmulation wenig erfolgversprechend ist. In Kombination mit zusätzlichen Reifungssignalen könnte Flt-3L jedoch in der Zukunft eine Rolle in der onkologischen Immuntherapie spielen.

# 1 Einleitung

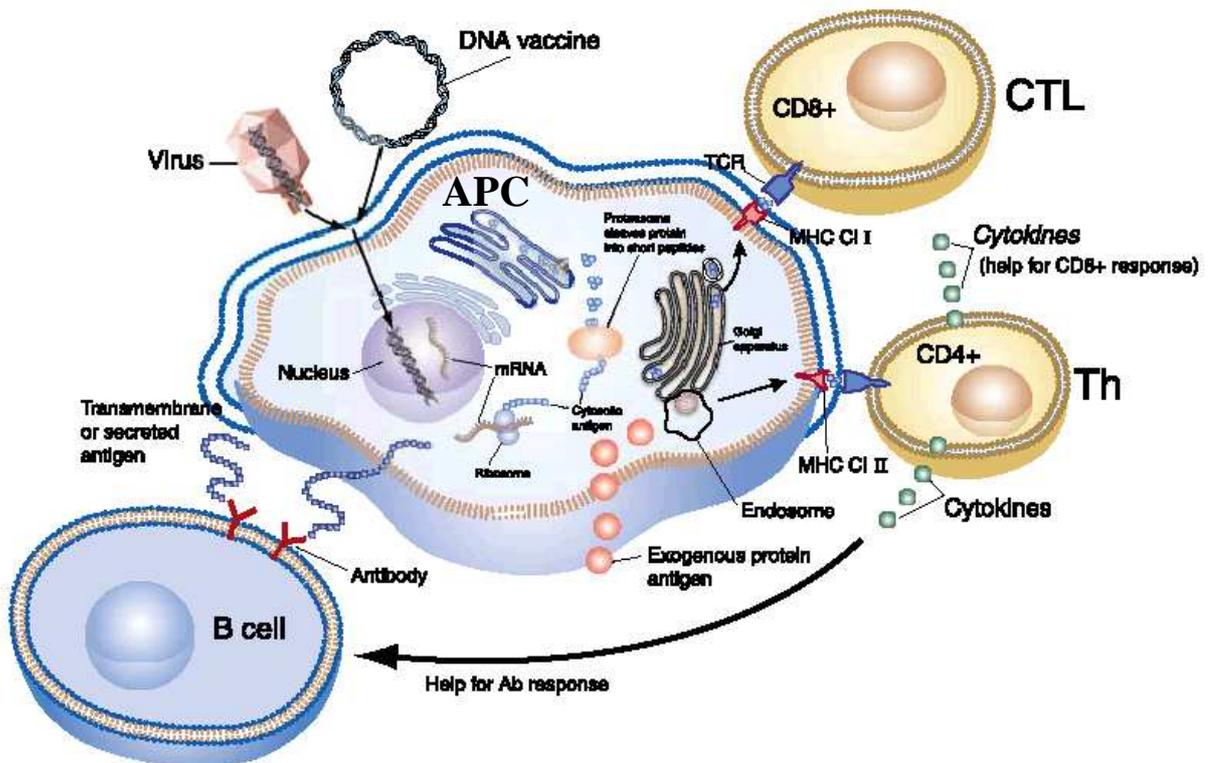
## 1.1 Immuntherapie

Die Beobachtung von Tumorregression nach Infektion mit Bakterien führte zur Erforschung bakterieller Extrakte als Behandlungsmethode für Tumorpatienten zu Beginn des letzten Jahrhunderts [5]. Das Interesse an Immuntherapie verschwand in den darauffolgenden Jahren jedoch wieder aufgrund mangelnder Erfolge und aufkommender Chemotherapeutika. Erst die Aufklärung der molekularen Mechanismen und der immunologischen Signalwege, die ausgelöst werden, wenn B- und T-Zellen eine Immunantwort gegen Tumorzellen hervorrufen, hatte neue Strategien und Versuchsansätze in der Entwicklung von Anti-Tumor-Immuntherapeutika ermöglicht.

Für die Aktivierung von T-Zellen ist ein Signal über den T-Zellrezeptor in Kombination mit kostimulatorischen Faktoren notwendig. Dieses Signal wird durch eine antigenpräsentierende Zelle (APC) in einem speziellen Zytokinmilieu vermittelt (s. Abb. 1-1).

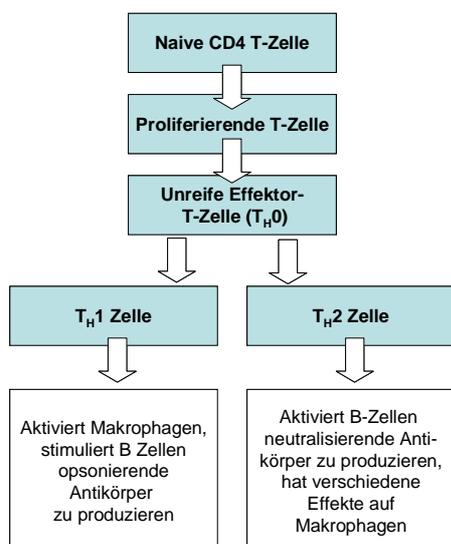
Die Erkennung des Antigens durch die T-Zelle setzt die Bildung eines trimolekularen Komplexes bestehend aus MHC (Major-Histocompatibility-Complex), TCR (T-Zellrezeptor) und dem intrazellulär prozessierten Peptid des Antigens voraus [6]. Die Peptide der T-Zelle können in Assoziation mit MHC-Klasse I- oder Klasse II-Molekülen präsentiert werden. Die Präsentation in Zusammenhang mit MHC-Klasse I-Molekülen führt zu einer  $CD8^+$  T-Zellantwort, die Präsentation in Zusammenhang mit MHC-Klasse II-Molekülen zu einer  $CD4^+$  T-Zellantwort [7].

Im Gegensatz zu den meisten Zellen, die nur Peptide, die sich frei im Zytoplasma befinden, in MHC-Klasse I-Moleküle laden [8], können dendritische Zellen auch extrazelluläre Peptide in MHC-Klasse I-Moleküle laden. In MHC-Klasse II-Moleküle werden Peptide geladen, die sich in lysosomalen Vesikeln befinden und damit hauptsächlich von extrazellulär kommen, wie z. B. bakterielle Proteine, Toxine und extrazelluläre Parasiten.



**Abb. 1-1:** Immuntherapie: Das Ziel der Tumorstimmung ist die Stimulierung und Expansion von Tumorantigen-spezifischen  $CD8^+$ T-Zellen, die durch Präsentation des TSA (tumor specific antigen) im Zusammenhang mit MHC-Molekülen und kostimulatorischen Signalen in APCs aktiviert wurden.

$CD8^+$  T-Zellen führen zu einer zytotoxischen Immunantwort, während bei  $CD4^+$  T-Zellen deren weitere Differenzierung bzw.  $T_H1$ -/ $T_H2$ -Polarisierung darüber entscheidet, ob eine Antikörperantwort oder eine zytotoxische Antwort erfolgt (s. Abb.1-2).



**Abb. 1-2:** Die Differenzierung der aktivierten  $CD4^+$  T-Zelle entscheidet über den weiteren Verlauf der Immunantwort (nach Janeway, Travers, Immunologie)

Zytokine, die in der Frühphase der Immunantwort gebildet werden, entscheiden letztlich über die Differenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen oder CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen, wobei dieser Schritt der T-Zelldifferenzierung noch nicht vollständig verstanden ist. Die durch P. Matzinger formulierte „Danger theory“ geht davon aus, dass das Immunsystem nicht zwischen „selbst“, d. h. zum Organismus gehörend, und „nicht-selbst“ diskriminiert, sondern das Vorhandensein eines Pathogens erkennt [9-11]. Als Gefahrensignale können dabei bakterielles LPS, bakterielle DNA und virale RNA dienen, welche über sogenannte „pattern recognition receptors“ (PRR) auf APCs erkannt werden, aber auch indirekte Signale, die durch Stress oder Nekrose von organismuseigenem Gewebe hervorgerufen werden [12]. Zu den PRRs gehört die Gruppe der Toll-like receptors (TLR), die verschiedene mikrobielle Produkte wie LPS, Proteoglykane oder Mannane erkennen kann [13]. TLRs werden vor allem auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Die Erkennung der Pathogene führt zu einer Freisetzung von Zytokinen, die die weitere Polarisierung der Immunantwort beeinflussen. LPS kann aber auch direkt zur Reifung von dendritischen Zellen beitragen [14]. Ist die naive T-Zelle aktiviert, exprimiert sie verschiedene Gene, die für die klonale Vermehrung und Differenzierung verantwortlich sind, wie z. B. IL-2 [15,16]. Kostimulatorische Signale sind entscheidend dafür verantwortlich, welche Zytokine sezerniert werden und damit, welcher Differenzierungsweg von der T-Zelle eingeschlagen wird. Ein wichtiges kostimulatorisches Signal ist der CD40-Ligand, der an CD40 auf den APCs bindet. Die CD40/CD40L-Interaktion führt einerseits zur Aktivierung der T-Zellen und andererseits zur Expression von B7-Molekülen durch die APCs, was die T-Zellproliferation weiter anregt. B7-Moleküle gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und finden sich auf der Oberfläche von Zellen, die eine T-Zellproliferation auslösen können. Die CD40/CD40L-Interaktion veranlasst die dendritischen Zellen IL-12 zu sezernieren, das eine Differenzierung der T-Zellen in Richtung T<sub>H</sub>1-Antwort begünstigt. IL-12 und IFN- $\gamma$  differenziert naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorwiegend zu T<sub>H</sub>1-Zellen, während naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die unter dem Einfluss von IL-4 und IL-6 stehen, vorwiegend zu T<sub>H</sub>2-Zellen ausdifferenzieren [17]. IL-12 wird hauptsächlich von dendritischen Zellen und Makrophagen produziert, IFN- $\gamma$  von NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die jeweiligen T<sub>H</sub>-Subtypen können das Wachstum und die Effektorfunktionen anderer Immunzellen regulieren [18]. So kann zum Beispiel IFN- $\gamma$ , ein Produkt der T<sub>H</sub>1-Zellen, die Aktivierung von T<sub>H</sub>2-Zellen verhindern und IL-10, Produkt der T<sub>H</sub>2-Zellen, vermag die Entwicklung von T<sub>H</sub>1-Zellen zu inhibieren (s. auch Kap. 1.2.4). Eine T<sub>H</sub>2-Antwort kann eine vorübergehende Tumorregression zur Folge haben,

eine dauerhafte Tumorabstoßung erfordert jedoch in der Regel eine T<sub>H</sub>1-Antwort [19-22]. Der Erfolg einer Tumorstimmung ist vom Tumorantigen, von der bestehenden Tumorzellmasse [23], von einer adäquaten Antigenpräsentation im geeigneten Microenvironment, vom effizienten Antigen- bzw. Gentransfer und letztlich von der Art der Immunantwort abhängig.

Das Tumorantigen kann auf unterschiedliche Weise in den Organismus eingebracht werden. Man unterscheidet zellbasierte von nicht zellbasierten Methoden. Zu den zellbasierten Methoden zählt die Vakzinierung mit dendritischen Zellen, die zuvor entweder mit Peptiden bzw. Proteinen gepulst worden sind oder mit DNA, RNA oder einem viralen Vektor transfiziert worden sind. Zu den nicht zellbasierten Vakzinen gehören Peptide und Proteine in Kombination mit einem Adjuvans und DNA- oder RNA-Vakzine, die auf unterschiedliche Art und mit verschiedenen Adjuvantien verabreicht werden können (s. Kap. 1.4).

## 1.2 Dendritische Zellen

Jede Zelle, die MHC-Moleküle exprimiert, kann als antigenpräsentierende Zelle fungieren, jedoch haben nur spezifische Zellen die Fähigkeit, Antigen-spezifische T-Zellen zu stimulieren und eine systemische Immunreaktion auszulösen. Dazu gehören DCs, Makrophagen/Monozyten und B-Zellen [24-26].

Dendritische Zellen (DCs) werden als die effektivsten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems angesehen und sind möglicherweise die einzigen APCs, welche naive T-Zellen effektiv „primen“ können. Dendritische Zellen werden im unreifen Zustand in den peripheren Geweben gefunden, wo sie Antigene aufnehmen und prozessieren, die dann zu sekundär-lymphatischen Organen transportiert werden, wo die T-Zellaktivierung stattfindet [27]. T-Zellaktivierung kann bei sehr niedrigen DC:T-Zellratios ausgelöst werden (1:50-1:200) [28].

Dendritische Zellen haben ihren Ursprung im Knochenmark, CD34<sup>+</sup> Stammzellen reifen dort zu Vorläuferzellen der dendritischen Zellen heran. Im Blut machen die dendritischen Zellen weniger als 0,5 % der mononukleären Zellen aus, sind aber in allen lymphoiden und nicht-lymphoiden peripheren Geweben anzutreffen. Dendritische Zellen haben lange zytoplasmatische Ausläufer, wenige intrazytoplasmatische Organellen, jedoch viele Mitochondrien und besitzen eine hohe Motilität [29].

### 1.2.1 Antigenaufnahme und -prozessierung

Nur die unreifen DCs sind in der Lage in der Peripherie mittels Phagozytose, Mikropinozytose und rezeptor- und lectinvermittelter Endozytose Antigen aufzunehmen [30-32].

Die Antigenprozessierung kann auf zwei verschiedenen Hauptwegen erfolgen, dem endogenen oder dem exogenen Pathway. Beim exogenen Pathway werden Antigene mittels Phagozytose oder rezeptorvermittelter Endozytose aufgenommen, in Endosomen abgebaut und die Peptide werden auf MHC-II-Moleküle geladen [33].

Antigene im Zytoplasma werden von Proteasomen prozessiert und werden ins endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie mit MHC-I-Molekülen assoziiert werden (endogener

Pathway) [34]. DCs können auch über den exogenen Pathway Peptide in MHC-Klasse I-Moleküle laden (cross-priming) [35].

Die Fähigkeit des Immunsystems, Moleküle zu erkennen, die bei vielen Pathogenen vorkommen, wird ausgenutzt, um mit Hilfe von Adjuvantien einen bestimmten Antigenprozessierungsweg zu begünstigen. Bakterielle DNA hat eine starke immunstimulatorische Aktivität, dies wird der Anwesenheit von unmethylierten CpG-Dinucleotiden zugeschrieben. Werden die CpG-Dinucleotide mit Hilfe einer CpG-Methylase methyliert, verliert die bakterielle DNA ihre immunstimulatorischen Eigenschaften [36]. Die bakteriellen CpG-Motive werden in der Maus vom TLR9 erkannt. TLR9 wird unter anderem von dendritischen Zellen und B-Zellen intrazellulär im endosomalen Kompartiment exprimiert. Humane dendritische Zellen exprimieren jedoch weniger oder kein TLR9 [37-39]. Die Aktivierung der TLR9-Signalkaskade durch bakterielle DNA führt zur Proliferation und Aktivierung der Zellen mit Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie Typ-I-Interferonen und IL-12. IL-12, das ebenfalls als Adjuvans eingesetzt wird, ist beteiligt an der Differenzierung von naiven T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen und stimuliert die Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Es reduziert die IL-4-vermittelte Suppression von IFN- $\gamma$ . LPS (Lipopolysaccharid) und MPL (Monophosphoryl-Lipid A) sind ebenfalls bakterielle Produkte, die zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) aktivieren können [40]. LPS ist ein Endotoxin, das an den CD14/TLR4/MD2-Rezeptorkomplex binden kann, was die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen zur Folge hat. MPL kann ebenfalls an Toll-like-Rezeptoren binden. Weitere Adjuvantien sind Zytokine wie IL-2 und GM-CSF und Hitzeschockproteine.

Es gibt Adjuvantien, die in der Lage sind, Antigene direkt ins Zytoplasma zu befördern, um den endogenen Antigenprozessierungsweg zu bevorzugen [41]. Dazu gehören zum Beispiel Mikropartikel, wie z. B. PLGA-Mikrosphären (poly-lactic-co-glycolic acid) oder Virus-artige Partikel (VLPs, virus-like particles), oder auch immunstimulatorische Komplexe (ISCOMs), Mizellen aus einer Mischung von Quil A und Cholesterol [42].

## 1.2.2 Reifung und Migration

Nach der Aufnahme von Antigen und unter dem Einfluss inflammatorischer Mediatoren beginnen die DCs zu reifen (s. Abb. 1-3). Im Laufe des Reifungsprozesses regulieren die DCs

die Antigenaufnahme und -prozessierung herunter und exprimieren CD83. MHC wird hochreguliert und die kostimulatorischen Moleküle, u. a. CD40, CD80 und CD86, und der Chemokinrezeptor CCR7 werden exprimiert. CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) gehören zur Immunglobulinsuperfamilie und sind Liganden für CD28 und CTLA-4. Sie werden nicht nur auf DCs, sondern auch auf aktivierten B-Zellen exprimiert. CD40 gehört zur TNF-Familie und bindet CD154 (CD40L) und wird ebenfalls auf B-Zellen exprimiert.

DCs wandern während der Reifung zu den Lymphknoten, um dort spezifische antigen-reaktive T-Zellen zu aktivieren.

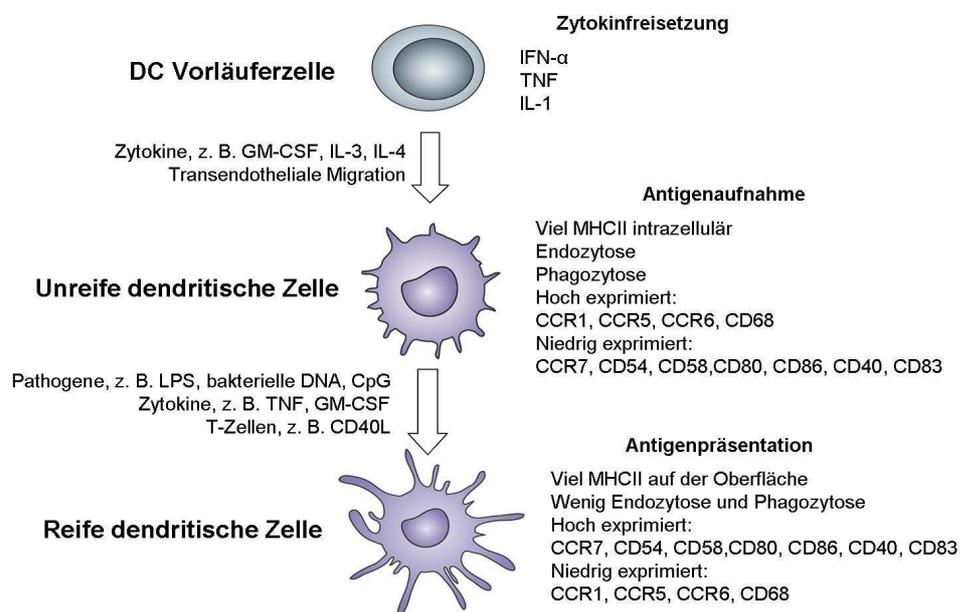


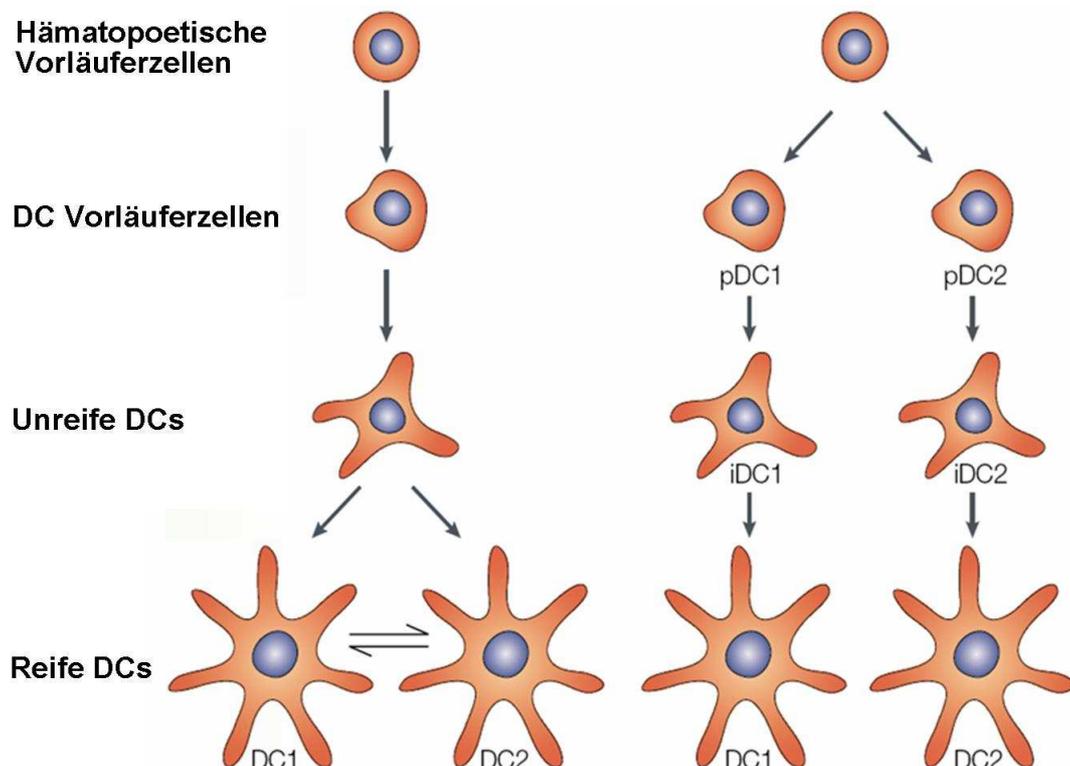
Abb.1-3: Reifungsprozess von Dendritischen Zellen

### 1.2.3 Subtypen von dendritischen Zellen

Alle DCs sind in der Lage, Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihres Phänotyps, ihrer immunologischen Funktion und Gewebeverteilung [3]. Nach der immunologischen Funktion kann man Vorläuferzellen von konventionellen und inflammatorischen DCs abgrenzen [43]. Den dendritischen Vorläuferzellen fehlt noch die dendritische Morphologie, sie können sich jedoch ohne Zellteilung durch einen inflammatorischen oder mikrobiellen Stimulus zu dendritischen Zellen entwickeln. Die konventionellen DCs lassen sich unterteilen in die „migratory DCs“, die in der Peripherie Antigen aufnehmen und anschließend zum lymphatischen Gewebe wandern, wie z. B. die

Langerhans-Zellen, und die „lymphoid-tissue-resident DCs“, die stets im lymphatischen Gewebe verbleiben. Die „lymphoid-tissue-resident DCs“ nehmen im lymphatischen Gewebe Antigen auf und präsentieren Fremd- und Eigenantigene. Inflammatorische dendritische Zellen lassen sich erst auf mikrobiellen oder inflammatorischen Stimulus hin nachweisen. Ein Beispiel wären die TNF- und iNOS-(induzierbare NO-Synthase) produzierenden DCs (Tip-DCs).

Ursprünglich wurden alle DCs als myeloischen Ursprungs betrachtet, eng verwandt zu Monozyten, Makrophagen und Granulozyten. Inzwischen weiß man jedoch, dass sie auch von lymphoiden Progenitoren ausgehen können. Dies hat zur Gegenüberstellung zweier DC-Modellsysteme geführt (s. Abb. 1-4). Das Modell der spezialisierten hämatopoetischen Linie geht davon aus, dass die Zuordnung zu einem speziellen DC-Subtyp bereits früh in der Hämatopoese erfolgt und die DCs sich danach als separate Subtyplinien mit unterschiedlichen Funktionen entwickeln. Das Modell der funktionellen Variabilität postuliert, dass die verschiedenen DC-Subtypen lediglich verschiedene Aktivierungszustände bzw. Entwicklungsstufen ein und derselben hämatopoetischen Linie darstellen, die durch unterschiedliche lokale Gegebenheiten hervorgerufen werden [3,44-46].



**Abb. 1-4:** Alternative Modelle für die Entstehung von funktionell unterschiedlichen DC-Subtypen. Modifiziert nach [3]. Links das Modell der funktionellen Variabilität, rechts das Modell der spezialisierten hämatopoetischen Linie.

Die unterschiedlichen DC-Subtypen können anhand ihrer Oberflächenmarker unterschieden werden. Als Marker zur Charakterisierung von murinen DC-Subtypen dienen CD4, CD8 $\alpha$  homodimer, CD205, CD11b (Mac-1) und CD11c [47], humane DC-Subtypen können mit Hilfe von CD14, CD11c, IL-3R $\alpha$  und BDCA-Antikörpern differenziert werden [48,49].

CD11c (CR4) liegt das Gen ITGAX zugrunde, es kodiert die Integrin-alpha-X-Kette. Integrine spielen unter anderem eine Rolle bei der Zelladhäsion und Phagozytose. CD11c wird in der Maus auf DCs, ihren Vorläuferzellen und Langerhans-Zellen exprimiert. Beim Menschen wird CD11c außer auf DCs auf Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und bestimmten B-Zellen exprimiert. CD11b (Mac-1) gehört ebenfalls zur Integrinfamilie und wird auf myeloischen und NK-Zellen exprimiert. Es bindet an CD54, an die Komplementkomponente iC3b und an extrazelluläre Matrixproteine. CD205 (auch LY75, DEC-205, GP200-MR6) ist ein Typ I-Transmembranprotein und wird ausschließlich auf DCs exprimiert. Es spielt vermutlich eine Rolle als Rezeptor bei der Antigenaufnahme.

### 1.2.3.1 Murine DCs

Auf allen reifen murinen DCs werden CD11c und MHC-Klasse II hoch exprimiert. Dendritische Zellen aus Maussplenozyten können unterteilt werden in CD8<sup>+</sup> DCs, die CD8 hoch exprimieren und CD8<sup>-</sup> DCs. Die CD8<sup>+</sup> und CD8<sup>-</sup> DCs unterscheiden sich bezüglich ihrer Immunfunktionen, einschließlich Zytokinproduktion [50,51] und ihrer Antigenpräsentation über MHC-Klasse II-Moleküle [52]. Die CD8<sup>-</sup> DCs lassen sich weiter unterteilen in CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> [53] (s. Tab. 1-1), die CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> DCs machen den größten Teil aus.

DC-Subtypen	Milz	Mesenterial-Lymphknoten	Haut-Lymphknoten	Thymus
CD8 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD205 <sup>hi</sup> CD11b <sup>-</sup> (lymphoide DCs)	++	+	+	+++++
CD8 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> CD205 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> (myeloische DCs)	++++	+/-	+/-	CD8 <sup>lo/-</sup> CD11b <sup>-</sup> (+) CD8 <sup>lo/-</sup> CD11b <sup>+</sup> (+/-)
CD8 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD205 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> (myeloische DCs)	++	+++	++	
CD8 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD205 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> (myeloische DCs)	+/-	++	++	
CD8 <sup>lo</sup> CD4 <sup>-</sup> CD205 <sup>hi</sup> CD11b <sup>+</sup> (Langerhans DCs)	-	+/-	+	

**Tab. 1-1:** DC-Subtypen in lymphatischem Gewebe von Mäusen. Alle hier aufgeführten DCs sind CD11c<sup>+</sup> und exprimieren MHC-Klasse II. Im Thymus sind nicht alle Subtypen vorhanden. Relative Häufigkeiten der DC-Subtypen: 50-70% (++++), 30-50% (+++), 20-30% (++) , 10-20% (+) and <5% (+/-). Modifiziert nach [2]

Dendritische Zellen aus dem Thymus sind zum überwiegenden Teil  $CD8^+CD4^-CD205^{hi}CD11b^-$  (70 %), während im Lymphknoten und der Milz lediglich 20 % der DCs den  $CD8^+CD4^-$  Phänotyp besitzen [47]. Ein Drittel der DCs in Hautlymphknoten sind  $CD8^{lo}CD4^-CD205^{hi}CD11b^+$ , während in mesenterialen Lymphknoten nur wenige diesen Phänotyp haben. Da diese DCs auch Langerin (CD207) exprimieren, das ein Langerhans-Zellmarker ist, wird vermutet, dass diese reife Formen der Langerhanszellen nach Migration darstellen [53].

Die Vertreter der hämatopoetischen Abstammungstheorie gehen davon aus, dass die  $CD8^+$  DCs lymphoiden Ursprungs sind, während die  $CD8^-$  DCs myeloischen Ursprungs sind.  $CD11b$  wird auf myeloischen DCs exprimiert, nicht aber auf lymphoiden DCs.  $CD205$  und  $CD1d$  werden von lymphoiden DCs höher exprimiert, können jedoch auch auf myeloischen DCs hochreguliert werden, z. B. durch LPS. Für die Theorie der hämatopoetischen Abstammungslinien spricht einerseits, dass durch Behandlung von myeloischen Vorläuferzellen mit GM-CSF Granulozyten, Monozyten und myeloische DCs erhalten werden [54,55] und andererseits, dass sich nach Rekonstitution myeloabladiertter Mäuse mit lymphoiden Vorläuferzellen DCs entwickeln, die  $CD8$ , jedoch keine myeloischen Marker exprimieren. Neuere Studien gehen jedoch eher davon aus, dass alle DCs sowohl von lymphoiden als auch von myeloischen Zelllinien abstammen können [44,46]. Es zeigte sich dabei, dass alle wichtigen DC-Populationen sowohl von common myeloid precursor (CMP) Zellen alleine, als auch von common lymphoid precursor (CLP) Zellen alleine erzeugt werden können. Dies zeugt von einer hohen Differenzierungsfähigkeit früher Vorläuferzellen [45].

Lymphoide DCs sind in den T-zellreichen Regionen von Milz und Lymphknoten lokalisiert [56-59], während myeloische DCs sich in den "marginal zone bridging channels" der Milz befinden, jedoch unter inflammatorischen Signalen wie z. B. LPS zu den T-Zell-reichen PALS (periarteriolar lymphatic sheaths) migrieren. In vitro zeigen die lymphoiden DCs eine geringere Fähigkeit  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen zu aktivieren [60,61], in vivo scheinen beide jedoch gleichermaßen fähig zu sein, Antigen-spezifische  $CD4^+$  T-Zellen zu aktivieren [51,62]. Das Verhältnis von Langerhans-Zellen zu lymphoiden und myeloischen DCs ist in Mäusen nicht vollständig verstanden. Nach Sensibilisierung gegen ein Antigen in der Haut findet man in den Lymphknoten myeloische DCs, die in die Lymphknoten migrierte Langerhans-Zellen repräsentieren [63].

### 1.2.3.2 Humane DCs

Menschliche DCs mit murinen DCs zu vergleichen ist schwierig, da Blut die einzige leicht zugängliche Quelle für DCs von Menschen ist und die humanen DCs sich bezüglich ihres Phänotyps stark von murinen unterscheiden. So exprimieren menschliche DCs zum Beispiel nie CD8. Die DCs aus humanem Blut sind sehr heterogen bezüglich ihrer Oberflächenmarker, stellen jedoch eher unterschiedliche Reifungs- und Aktivierungsstufen als eigenständige Subtypen dar [64,65]. Die humanen DCs zeigen ähnlich den murinen DCs eine hohe Wandlungsfähigkeit abhängig vom Zytokinmilieu und eventuell vorhandenen Pathogenen. Im Blut finden sich unreife DCs (immature DCs, iDC) und reifere, spezialisiertere DCs (pre-DCs, pDC), die sich in vitro relativ einfach zu bestimmten DC-Typen ausreifen lassen [48,49]. Drei verschiedene dieser spezialisierteren DC-Vorläuferzellen lassen sich im Blut unterscheiden,  $CD14^+CD11c^+$  Monozyten (pDC1),  $CD14^-CD11c^+$  Vorläuferzellen und  $CD14^-CD11c^-IL-3R\alpha^+$  Vorläuferzellen, auch als plasmacytoide DCs oder pDC2 bezeichnet (s. Abb. 1-5).

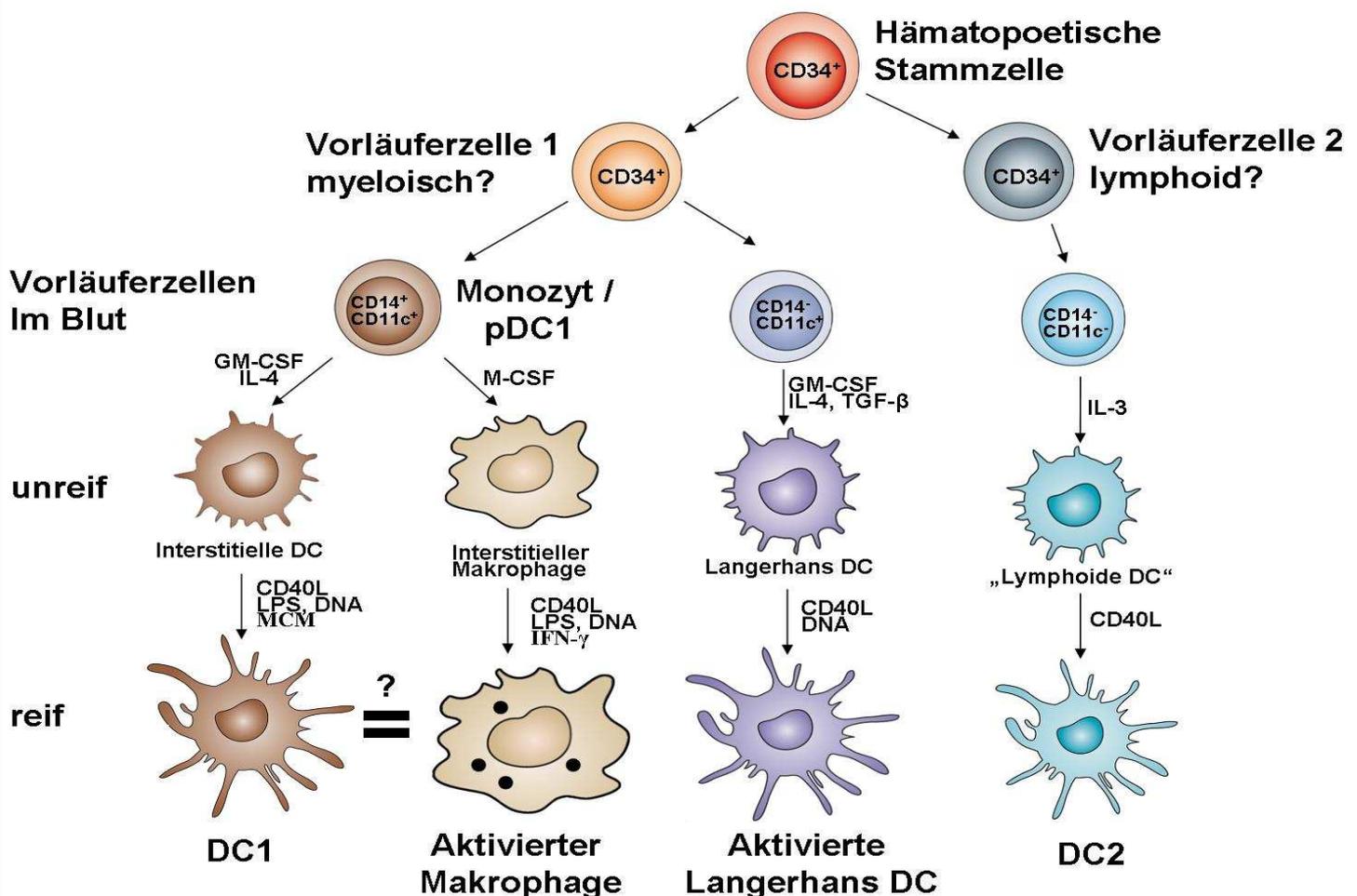


Abb. 1-5: Drei Subtypen von humanen DCs, Modifiziert nach [3]

Es wird vermutet, dass die CD11c<sup>+</sup> Vorläuferzellen myeloischen und die CD11c<sup>-</sup> Vorläuferzellen lymphoiden Ursprungs sind, jedoch wird die Existenz von humanen lymphoiden DCs kontrovers diskutiert [66,67]. Die CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> Monozyten, auch als pDC1 bezeichnet, werden am häufigsten als Vorläufer benutzt, um in vitro humane DCs zu generieren. Werden diese mit M-CSF behandelt, differenzieren sie zu Makrophagen, werden sie jedoch mit GM-CSF und IL-4 behandelt, reifen sie innerhalb von sechs Tagen zu DC1 [68-70]. Diese können mit Hilfe von LPS oder TNF- $\alpha$  weiter zu reifen CD14<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>MHC-II<sup>hi</sup> DCs differenzieren. Die CD4<sup>+</sup>IL-3R<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> pDC2 produzieren Interferon- $\alpha/\beta$  und reagieren auf virale oder bakterielle Stimulation mit der Produktion von Typ-I-Interferon, sie exprimieren intrazellulär MHC-Klasse II, präsentieren es jedoch nicht auf der Oberfläche [71,72]. Durch Kultivierung mit IL-3 und CD154 oder durch bakterielle oder virale Stimulation können die pDC2 ausgereift werden zu DC2. Erst kürzlich ist für diese Art von DCs auch ein entsprechendes Mausäquivalent im Blut [73] und in lymphatischem Gewebe [74-77] entdeckt worden. Diese DCs, die den Oberflächenphänotyp CD45RA<sup>hi</sup>B220<sup>+</sup>CD11c<sup>lo</sup>CD11b<sup>-</sup>MHC-II<sup>lo</sup> besitzen, können wie die humanen DCs Typ-I-Interferone produzieren [78], jedoch zeigen die Maus-pDCs im Gegensatz zu den humanen keine IL-3R Expression und exprimieren zum Teil CD8.

Die CD14<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> Vorläuferzellen entwickeln sich unter dem Einfluss von GM-CSF, IL-4 und TGF- $\beta$  zu Langerhans-DCs und zu Makrophagen durch M-CSF, wobei diese später ebenfalls zu DCs differenzieren können.

## 1.2.4 DC-Subtypen und Induktion von T-Zell-Immunität

Bedingt durch die funktionelle Vielfalt und die Wandlungsfähigkeit der DCs stellt sich die Zuordnung spezifischer Funktionen zu den einzelnen DC-Subtypen schwierig dar. Für CD8<sup>+</sup> DCs wurden sowohl immunstimulatorische als auch tolerogene Eigenschaften beschrieben [50,51,57,60-62,79,80]. Durch ein unterschiedliches Microenvironment, unterschiedliche bakterielle Stimuli sowie Zeit und Stärke der Aktivierung können ganz unterschiedliche funktionelle Antworten der DCs hervorgerufen werden. DC-Subtypen beeinflussen über die kostimulatorischen Moleküle und die sezernierten Zytokine die Art der über CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen ausgelösten Immunantwort.

### 1.2.4.1 Murine DC-Subtypen

Bei Mäusen beeinflussen CD8<sup>+</sup> lymphoide Milz-DCs naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen dahingehend, dass sie T<sub>H</sub>1-Zytokine sezernieren, während CD8<sup>-</sup> myeloische Milz-DCs eine T<sub>H</sub>2-Zytokinsekretion hervorrufen. Die CD8<sup>+</sup> lymphoiden, nicht aber die CD8<sup>-</sup> myeloischen murinen DCs sind in der Lage, große Mengen an IL-12 und IFN- $\gamma$  zu produzieren. IL-12 defiziente Mäuse können keine T<sub>H</sub>1-Immunantworten induzieren, was die entscheidende Rolle von IL-12 bei der von lymphoiden DCs induzierten Immunantwort bei Mäusen belegt.

### 1.2.4.2 Humane DC-Subtypen

Auch beim Menschen gibt es Hinweise, dass bestimmte Subtypen von DCs die Immunantwort in eine Richtung polarisieren. So können aktivierte DCs vom Typ 1 eine T<sub>H</sub>1-Antwort begünstigen, während aktivierte DCs vom Typ 2 eine T<sub>H</sub>2-Antwort auslösen [72]. Das Zytokinprofil, das dabei von den T-Helferzellen sezerniert wird, ist abhängig von der IL-12 Sekretion der DCs (s. Abb. 1-6) [81].

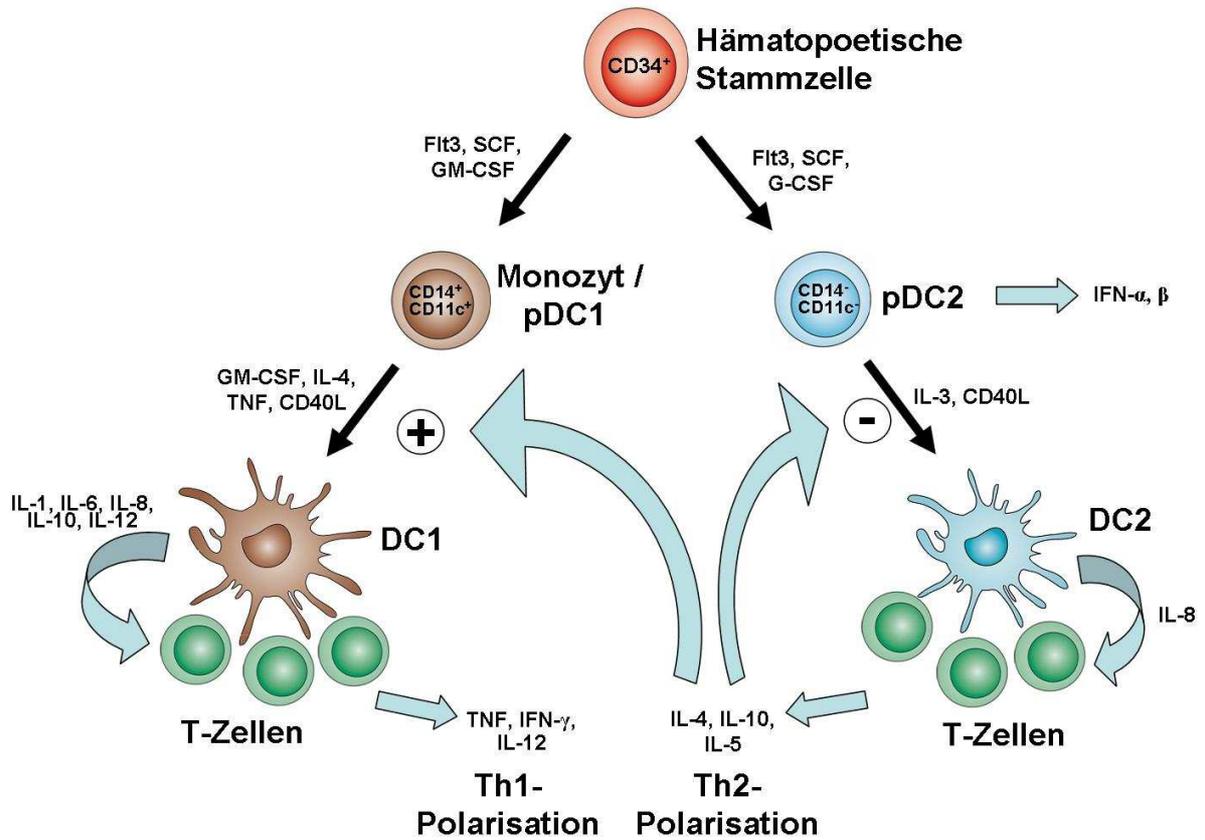


Abb. 1-6: Einfluss unterschiedlicher DC-Subtypen auf die Polarisierung von T-Helferzellantworten beim Menschen. Modifiziert nach [4]

### 1.3 Tumorstimmung mit DC-basierten Zelltherapeutika

Für die Tumorstimmung mit DCs müssen zunächst autologe dendritische Zellen vom Patienten gewonnen werden. Dazu werden in der Regel Monozyten aus dem peripheren Blut des Patienten *ex vivo* ausdifferenziert [82]. Andere Vorgehensweisen beruhen auf der Vermehrung von DC-Vorstufen aus dem Knochenmark oder differenzierter DCs aus dem peripheren Blut. Die DCs werden mit spezifischen Tumorstigenen oder Tumorstysaten beladen. Anstelle der Peptide oder Proteine selbst können auch DNA oder RNA verwendet werden, die für das entsprechende Antigen kodieren. Diese werden über Transfektion oder mit Hilfe viraler Vektoren in die DCs eingebracht [83-86]. Die modifizierten DCs werden dem Patienten intradermal, subkutan, intravenös oder direkt in den Tumor appliziert. Die dendritischen Zellen können nicht nur durch Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen zur Tumorstregression beitragen, sondern können auch die Überlebenszeit von CTLs verlängern, indem sie diese vor tumorinduzierter Apoptose schützen [87]. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass mit DCs, die entweder mit Tumorstysaten, Tumorstproteinextrakten oder synthetischen Peptiden gepulst wurden oder auch mit DCs, die mit bestrahlten Tumorstzellen fusioniert wurden, eine protektive Immunantwort auf nachfolgenden „tumor challenge“ erreicht werden kann [88-94]. Eine weitere Rationale für die dendritische Zelltherapie ist die Tatsache, dass bei Krebspatienten und in Tumormodellen zum Teil Defekte in der Reifung und Funktion der DCs nachgewiesen werden können, die eine ineffektive CTL-Antwort bedingen. Überstände von Tumorstzellen können die Reifung von DCs verhindern, was auf verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine wie z. B. IL-10, TGF- $\beta$  und VEGF [95] zurückgeführt werden kann.

Die Wirksamkeit der DC-Vakzinierung in klinischen Studien zeigte bisher uneinheitliche Untersuchungsergebnisse auf und ist insgesamt unbefriedigend. Dabei können neben dem individuellen Ansprechen auf eine Immuntherapie verschiedene Faktoren eine Rolle spielen, wie z. B. die Qualität der DCs, die Art der Generierung und Reifung der DCs, die Dosis und Technik der Antigenbeladung, der Injektionsweg bzw. -ort, die Anzahl der Vakzinierungen und die Immunsuppression des Patienten. Im Tierversuch zeigte sich ein besserer Vakzinierungserfolg bei multipler Vakzinierung gegenüber Einfachvakzinierung [88] sowie bei subkutaner und intradermaler DC-Injektion [96].

Vakziniert man gesunde Probanden mit unreifen DCs, gepulst mit Influenzamatixpeptid (FMP), kann Induktion von Toleranz beobachtet werden [97-99]. Deshalb werden in neueren Studien mit TNF- $\alpha$ , CD40-Ligand oder monozytenkonditioniertem Medium ausgereifte DCs [100,101] und Adjuvantien wie IFN- $\gamma$  oder IFN- $\alpha$  verwendet.

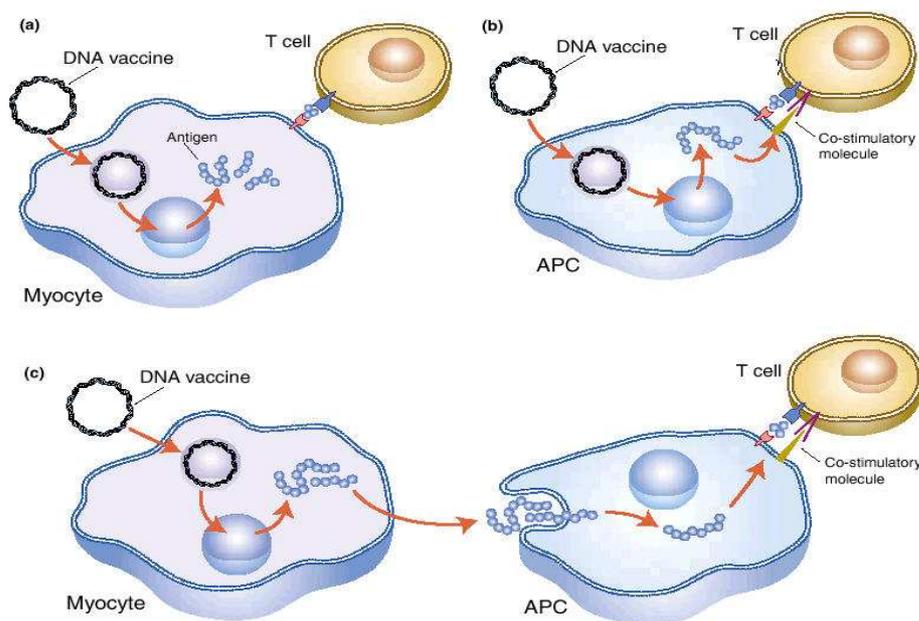
## 1.4 DNA-Vakzinierung

Die Entdeckung, dass DNA infektiöse und tumorigene Eigenschaften haben kann, wurde erstmals in den späten 50er Jahren gemacht, als Kaninchen mit DNA behandelt wurden, die aus Tumoren stammte, die mittels Papillomaviren induziert worden waren [102]. Die so behandelten Kaninchen entwickelten an der Inokulationsstelle Tumoren. Diese Entdeckung wurde über zehn Jahre später mit Hilfe eines Plasmidvektors, der Papillomavirus-DNA enthielt, reproduziert [103]. In den folgenden Jahren wurden immer weitere Erfolge bei der Aufnahme und Expression reiner DNA in lebende Zellen oder Organismen berichtet. In den 80er Jahren wurden die durch Plasmid-DNA ausgelösten Immunreaktionen näher charakterisiert [104,105]. Anfang der 90er Jahre konnte gezeigt werden, dass intramuskulär in Mäuse injizierte Plasmid-DNA von den Mausmyozyten aufgenommen wird und die von der Plasmid-DNA kodierten Proteine von den Myozyten exprimiert werden [106]. Kurz danach wurde der Begriff „genetische Immunisierung“ geprägt, als es gelang durch eine Vakzinierung mit einer „Gene Gun“ und Plasmid-DNA eine B-Zellimmunantwort auf das kodierte Genprodukt auszulösen [107]. Die erste protektive Immunantwort konnte 1993 beobachtet werden, als durch Immunisierung mit Plasmid-DNA gegen Influenza-A-Nukleoprotein erfolgreich die Infektion mit den entsprechenden Influenza-Stämmen verhindert werden konnte [108]. In Folge wurde für verschiedene infektiöse und onkologische Erkrankungen im Tiermodell gezeigt, dass eine protektive Immunisierung mittels DNA-Vakzinierung möglich ist [109,110].

### 1.4.1 Immunantwort nach DNA-Vakzinierung

Die durch eine DNA-Vakzinierung ausgelöste Immunantwort variiert in Art und Stärke je nach verwendetem Plasmid, dem kodierten Protein und dem verwendeten Promotor [111]. Die Plasmid-DNA wird nicht in das Genom integriert, sondern persistiert als zirkuläres nichtreplizierendes Episom im Zellkern [106]. Die Plasmid-DNA kann dabei sehr lange persistieren und bis zu 19 Monate im Muskel exprimiert werden [112]. DNA-Vakzinierung kann sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten hervorrufen, da das kodierte Antigen sowohl auf dem endogenen als auch auf dem exogenen Weg prozessiert wird [106,112,113]. Peptide werden auf MHC-Klasse I- und auf MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert. Es konnte

gezeigt werden, dass antigenpräsentierende Zellen dafür verantwortlich sind, naive zytotoxische T-Zellen nach intramuskulärer oder „Gene Gun“-DNA-Vakzinierung zu stimulieren [114-116]. Dabei können die antigenpräsentierenden Zellen das Antigen aufnehmen, indem sie entweder direkt transfiziert oder von anderen transfizierten Zellen beladen werden (s. Abb. 1-7) [114,116-120]. Das Antigen kann durch Lyse der transfizierten Zelle freigesetzt oder sezerniert werden, wobei die Rolle von Myozyten und Epithelzellen bei der direkten und indirekten Aktivierung von T-Zellen noch nicht vollständig geklärt ist.



**Abb. 1-7:** T-Zellaktivierung über unterschiedliche Wege nach DNA-Vakzinierung:  
 (a) direkte Aktivierung über Myozyt (umstritten); (b) direkte Aktivierung über APC;  
 (c) Antigenbeladung der APC über Myozyt und T-Zellaktivierung über APC

Ein Vorteil der bakteriellen Plasmidvektoren ist, dass sie unmethylierte Cytidinphosphat-guanosine (CpG) enthalten, die immunstimulatorisch wirken [121-125]. DNA-basierte Vakzine hat den Vorteil gegenüber peptidbasierter Vakzine, dass die MHC-Peptid-Komplexe über einen längeren Zeitraum exprimiert werden. Lösliche rekombinante Proteine werden hauptsächlich über den exogenen Weg prozessiert, der nur selten zu einer effektiven zytotoxischen Immunantwort führt.

Bei der DNA-Vakzinierung können verschiedene Promotoren verwendet werden, so dass eine konstitutive oder selektive Expression in bestimmtem Gewebe oder im Tumor selbst möglich ist.

Gegenüber Vakzinierung mit viralen Vektoren bietet die DNA-Vakzinierung den Vorteil, dass die Immunreaktion gegen den viralen Vektor vermieden wird, und dass keine Konkurrenz bei der Immunreaktion durch zusätzliche virale Epitope entsteht [126]. Gefahren, die durch virale Lebendimpfstoffe entstehen, werden bei der DNA-Vakzinierung ebenfalls vermieden [127].

### 1.4.2 Applikationswege

DNA kann durch intramuskuläre, intravenöse, subkutane und intradermale Injektion oder auch mittels Gene Gun appliziert werden. Vor allem für die intramuskuläre und intradermale Applikation mittels Gene Gun wurde gezeigt, dass eine starke Immunantwort induziert wird. Bei der Gene Gun Applikationsmethode werden Goldpartikel mit DNA beschichtet und dann mit hohem Druck, z. B. durch Heliumgas, ins Zielgewebe katapultiert, was sehr effektiv und atraumatisch erfolgt [128,129]. Immunisierung mittels Gene Gun benötigt viel weniger DNA und bewirkt eine 10 bis 100 mal höhere Genexpression im Vergleich zur klassischen intramuskulären Injektion [130]. Diese Applikationsmethode kann die DNA direkt in intradermale antigenpräsentierende Zellen transferieren, die dann zu Lymphknoten migrieren und dort Immunantworten auslösen [131], wobei die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Hauptrolle spielt [132,133]. Weitere neue Applikationswege für die DNA-Vakzinierung ist die Anwendung von Aerosolen sowie die in vivo Elektropermeabilisierung, bei der die Plasmid-DNA intramuskulär injiziert und anschließend in die Myozyten elektroporiert wird [134]. Mit einmaliger Verabreichung von Aerosolen, die DNA gebunden an Polyethylenimin enthalten, können anhaltende Immunantworten im Lungengewebe hervorgerufen werden [135].

Die klassische intramuskuläre Injektion von Plasmid-DNA ist eine aufgrund ihrer Einfachheit und Kostengünstigkeit oft angewandte und effektive Methode der DNA-Vakzinierung. Intramuskuläre Injektion von Plasmid-DNA induziert humorale und T-zelluläre Immunantworten, die in ihrer Stärke mit denen durch intradermale Injektion hervorgerufenen vergleichbar sind. Nach einer intramuskulären DNA-Vakzinierung kann vorzugsweise eine T<sub>H</sub>1-Immunantwort beobachtet werden, während intradermale Immunisierungen mit der Gene Gun öfters zu einer T<sub>H</sub>2-Antwort führen [136].

### 1.4.3 Verbesserung der Immunantwort nach DNA-Vakzinierung

Außer dem Applikationsweg hat auch das Applikationsschema einen bedeutenden Einfluss auf Stärke und Art der Immunantwort [137]. Durch die Kombination verschiedener Applikationswege und Optimierung des Vakzinierungsschemas kann die Immunogenität einer Vakzine verbessert werden [137]. Eine weitere Möglichkeit, Einfluss auf die Immunantwort zu nehmen, ist die Verwendung eines Adjuvans. So können zum Beispiel Zytokine als Immunmodulatoren eingesetzt werden. IL-2, IL-12 und IFN- $\gamma$  können unter bestimmten Voraussetzungen in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Antwort polarisieren und die zytotoxische T-Zellaktivität verstärken [138]. IL-4 resultiert in einem Shift in Richtung einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort [138]. Verschiedene Studien zeigten, dass die Verwendung von GM-CSF als Adjuvans zu einer deutlichen Verbesserung der Immunisierung mit Plasmid-DNA führt [139-142]. Durch die Verwendung eines für GM-CSF kodierenden Plasmids konnte die zur Auslösung der gleichen Immunantwort benötigte Menge an antigenkodierender Plasmid-DNA in einem Maus-Tumormodell deutlich reduziert werden [143]. Es wird vermutet, dass GM-CSF die Migration von antigenpräsentierenden Zellen an den Ort der Antigenexpression bewirkt und dadurch die Immunantwort verstärkt [144,145]. GM-CSF stimuliert die Proliferation und Aktivierung der APCs und induziert die Differenzierung zu reifen MHC-Klasse II-exprimierenden APCs. Welchen Effekt die verwendeten Zytokine auf die Vakzinierung haben, hängt sowohl vom Antigen als auch von den in die Immunreaktion involvierten Immunzellen ab [146].

Eine weitere Möglichkeit die Immunantwort zu verstärken, ist die Verwendung von Plasmid-DNA, die Replikons von Viren enthalten [147]. Um Immun-Escape-Mechanismen von Tumoren entgegenzuwirken, können kostimulatorische Moleküle, wie B7-1, B7-2 und CD40L verwendet werden [148,149]. Außer durch die CD40/CD40L Wechselwirkung als Vertreter der TNF-Rezeptorfamilie können DCs auch durch die Stimulierung von Chemokin- und Toll-like-Rezeptoren aktiviert werden (s. Tab. 1-2). Bei der Aktivierung der Chemokinrezeptoren spielen als Liganden MIPs, RANTES, MCPs, GCP-2, NAP-2, IL-8, SLC und SDF eine Rolle [150]. MIP-1 $\alpha$ , zum Beispiel, bindet an CCR5 (chemokine receptor 5) und rekrutiert APCs durch Chemotaxis an den Ort der Vakzinierungsstelle. Dies resultiert in einer verstärkten zellulären und humoralen Immunantwort [151]. Die Hochregulation von CCR7 und Herunterregulation von CCR5 in der Reifung der DCs führt dazu, dass die DCs zur Antigenpräsentation in die

Lymphknoten einwandern. Koimmunisierung mit RANTES kann CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellantworten deutlich verstärken [152]. Murine DCs besitzen TLR9 und können somit durch bakterielle DNA, die CpG-Motive enthält, aktiviert werden. Da menschliche DCs möglicherweise weniger TLR9 exprimieren, stellen CpG-Sequenzen für den Menschen kein effektives Vakzinierungsadjuvans dar [37-39].

Die Expansion von zytotoxischen T-Zellen lässt sich auch durch die Verwendung von Fusionsproteinen der Antigene mit entweder Mycobacterium tuberculosis, Heat Shock protein 70 oder Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A verstärken [153,154]. Auch die Fusion des Antigens an ein IgG-Fc Fragment kann die Immunantwort intensivieren [155]. Die Triggerung von Apoptose mittels FasL oder spezieller Caspasen als Vakzinierungsadjuvans kann ebenfalls durch vermehrte Antigenfreisetzung zur Verstärkung der Immunantwort führen [156,157].

<b>DC-Rezeptoren</b>	<b>Liganden</b>	<b>Effekt auf DCs</b>
<b>Chemokin-Rezeptoren</b>		
CCR1	MIP-1 $\alpha$ , RANTES	Rekrutierung
CCR2	MCP-1, -2, -3, -4	Rekrutierung
CCR5	MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , RANTES	Rekrutierung
CCR6	MIP-3 $\alpha$	Rekrutierung
CXCR1	GCP-2, NAP-2, IL-8	Rekrutierung
CCR7	MIP-3 $\beta$ , SLC	Rekrutierung
CXCR4	SDF-1 $\alpha$ , -1 $\beta$	Rekrutierung
<b>Toll-like-Rezeptoren</b>		
TLR2	Antigene	Reifung
TLR9 (Maus)	CpGs, HSP70	Reifung
<b>TNF-Rezeptorfamilie</b>		
Fas	FasL	Aktivierung und Reifung
CD40	CD40L	Aktivierung und Reifung
OX40L	OX40	Aktivierung

**Tab. 1-2:** Verstärkung von DNA-Vakzinierung mittels Rekrutierung, Aktivierung und Reifung von DCs über DC-Rezeptoren. **MIPs:** macrophage inflammatory proteins, **RANTES:** CCL5, regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted, **MCPs:** monocyte chemoattractant proteins, **GCP-2:** granulocyte chemotactic protein 2, **NAP-2:** neutrophil activating peptid 2, **SLC:** secondary lymphoid-tissue chemokine, **SDF:** stromal derived factor

### 1.4.4 $\beta$ -Galactosidase-Modellsystem

Da ein gut charakterisiertes Tumorantigen für Immunvakzinierungsversuche in den 90er Jahren fehlte, behalf man sich, indem man  $\beta$ -Galactosidase-transfizierte Tumorzelllinien als ein Modellsystem nutzte, um Immunantworten in Mäusen zu untersuchen [94].  $\beta$ -Galactosidase wurde als Modellantigen ausgewählt, da es als rekombinantes Protein, Peptid und in Form eines retroviralen Vektors zur Verfügung stand. Als Protein gelangt es nur über den endosomalen Weg in die Zelle.  $\beta$ -Galactosidase selbst kann zytotoxische T-Zellen nicht stimulieren. In diesem Modellsystem konnte nachgewiesen werden, dass eine  $\beta$ -Galactosidase-exprimierende Maustumorzelllinie in vivo tumorspezifische zytotoxische T-Zellen expandieren konnte und damit einen Schutz vor Tumorwachstum aufbauen konnte [94]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nur eine geringe Anzahl an in vitro  $\beta$ -Galactosidase-gepulsten DCs notwendig war, um eine schützende Immunantwort in vivo auszulösen. Aus dem Knochenmark stammende mit GM-CSF erzeugte DCs waren in der Lage, lösliches  $\beta$ -Galactosidase-Protein zu prozessieren und über MHC-Klasse I  $CD8^+$  T-Zellen zu präsentieren. Im gleichen Modellsystem wurde untersucht, ob sich Tumorzelllinien, die genetisch so modifiziert worden waren, dass sie entweder die Zytokine IL-7 bzw. IL-4 oder den Kostimulator B7.1 exprimierten, in Art und Umfang von Antigenpräsentation und Tumorabstoßung von nicht transfizierten Tumorzelllinien unterschieden [1]. Tumorzelllinien, die mit IL-7, IL-4 oder B7.1 transfiziert worden waren, zeigten eine bessere Tumorabstoßung und eine verstärkte indirekte Antigenpräsentation durch Empfänger-APCs. Die direkte Antigenpräsentation durch die Tumorzelllinien wurde nur durch die B7.1 transfizierten Tumorzelllinien verbessert, nicht durch die zytokintransfizierten Tumorzelllinien. Die Aktivierung von Empfänger-T-Zellen durch eine DC-basierte Vakzine wurde ebenfalls in diesem Modellsystem untersucht [158]. Dazu wurden Mäuse mit syngenem DCs vakziniert, die entweder mit  $\beta$ -Galactosidase-Peptid gepulst, mit  $\beta$ -Galactosidase-Protein beladen oder genetisch modifiziert worden waren,  $\beta$ -Galactosidase zu exprimieren. In den Mäusen wurden dadurch  $\beta$ -Galactosidase-spezifische zytotoxische T-Zellen induziert, die zu einer moderaten Tumorabstoßung führten. Dabei spielte es für die Effizienz der Tumorabstoßung keine Rolle, ob die DCs mit Peptid gepulst, mit Protein beladen oder genetisch modifiziert worden waren. In den vakzinierten Mäusen konnte eine vermehrte NK-Zellaktivität beobachtet werden, die zur Lyse der dendritischen Zellen und zur Freisetzung von Antigen führte. Das freigesetzte Antigen wurde von Empfänger-DCs aufgenommen und präsentiert.

## 1.5 Flt3-Ligand

Flt-3L steht für fms-like tyrosine-kinase 3 ligand, ein Glykoprotein, das die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen stimulieren kann. Flt-3L ist ein Typ I-Transmembranprotein und wird hauptsächlich von Knochenmarksstromazellen, myeloischen Zellen sowie B- und T-Zellen exprimiert [159].

Der Rezeptor für Flt-3L (flt-3) gehört zur Klasse-III-Rezeptortyrosinkinasefamilie, einer Gruppe von Wachstumsfaktorrezeptoren, die eine Rolle in der frühen Hämatopoese spielen. Diese Gruppe von Rezeptoren ist charakterisiert durch ihre intrinsische Kinaseaktivität nach Ligandenbindung. Die aktivierte Kinasedomäne wird autophosphoryliert und kann durch Phosphorylierung von Tyrosinresten an Zielproteinen weitere Signalkaskaden auslösen. Flt-3-Expression ist hauptsächlich auf frühe Vorläuferzellen von myeloischem und B-Zell-Ursprung beschränkt. Zur Klasse-III-Rezeptortyrosinkinasefamilie gehören auch der PDGF-Rezeptor  $\alpha$  und  $\beta$ , der "stem cell factor" (SCF) Rezeptor c-Kit und der M-CSF Rezeptor. Es wurde in vitro gezeigt, daß Flt-3 die Überlebensrate von hämatopoetischen Vorläuferzellen steigern kann und die Erneuerung reifer hämatopoetischer Zellen erleichtert. Er unterscheidet sich von SCF (Kit Ligand, KL) darin, dass er keinen Effekt auf Mastzellen und Melanozyten hat.

### 1.5.1 Hämatopoetische Effekte von Flt-3L

Im Mausmodell führt die Gabe von Flt-3L zu einer Vermehrung von Colony-Forming Units (CFU) im Knochenmark, in der Milz und im peripheren Blut [160]. Man beobachtet einen Anstieg der CFU-GM (CFU-Granulozyten-Makrophagen) und einen Anstieg der CFU-GEMM (CFU-Granulozyten-Erythrozyten-Monozyten-Megakaryozyten). Im Mausmodell steigen die CFU-GM und die CFU-GEMM in der Milz nach einer achttägigen Flt-3L-Gabe auf das über 100-fache, im peripheren Blut von Primaten wurde ein Anstieg der CFU nach zwölf-tägiger subkutaner Flt-3L-Gabe auf das über 500-fache beobachtet [161]. Die Gesamtleukozytenzahl wird ebenfalls bis auf das 2,5-fache des Ausgangswerts gesteigert. Die Gabe von Flt-3L zusammen mit G-CSF hat einen synergistischen Effekt auf die Mobilisierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen im Primaten-Modell [161].

### 1.5.2 Immunologische Effekte von Flt-3L

Flt-3L Gabe bei Mäusen führt zu einem signifikanten Anstieg an DCs im Blut, in der Milz, in der Leber, in den Lymphknoten und in der Lunge [162]. Diese DCs sind in der Lage, die T-Zellproliferation zu stimulieren und eine Antigen-spezifische Immunantwort auszulösen.

In Tumor-Challenge-Experimenten bei Mäusen zeigt die Flt-3L Anwendung in verschiedenen Modellen eine Antitumoraktivität. Bei einem Methylcholantren (MCA) induzierten Fibrosarkom führte die Flt-3L Gabe zur vollständigen Tumorregression bei einer signifikanten Anzahl von Mäusen und zu einer verminderten Tumorwachstumsrate [163]. Untersuchungen des Mechanismus der Antitumoraktivität ergaben, dass eine Abhängigkeit von einer CD8<sup>+</sup>-Effektorzellpopulation bestand. Die Tumore zeigten eine Infiltration mit Lymphozyten und DCs.

Die Wirkung von Flt-3L wurde ebenfalls im spontan entstehenden B16-Melanom und im EL-4-Lymphom, als auch im CL8-1-Melanommodell untersucht [164]. Diese Studien zeigen alle eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums. Immunhistochemische Färbungen von dendritischen Zellen zeigten einen Anstieg der Infiltration mit DCs in den Flt-3L-behandelten Mäusen sowohl beim B16-Melanom als auch beim EL-4-Lymphom, jedoch wurde kein Unterschied bei den immunhistochemischen Färbungen auf CD8<sup>+</sup>-Zellen gefunden.

### 1.5.3 Klinische Studien mit Flt-3L

Flt-3L wurde bereits aufgrund seiner vielversprechenden Rolle sowohl als hämatopoetischer Wachstumsfaktor als auch als Immuntherapeutikum bei Tumorerkrankungen in ersten klinischen Studien eingesetzt. Die Applikation von Flt-3L wird von gesunden Testpersonen gut vertragen [165]. Es wurde wie in den Mausmodellen eine signifikante Erhöhung von CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen und DCs im peripheren Blut gefunden [166]. Es laufen derzeit verschiedene Studien mit Flt-3L bei Tumorpatienten, unter anderem an Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom, Prostata Tumoren und Melanomen. Ebenfalls wird Flt-3L zusammen mit G-CSF und GM-CSF an Patienten evaluiert, die eine Stammzelltransplantation erhalten.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen einer adjuvanten Flt-3L-Applikation auf die durch eine DNA-Vakzinierung induzierte Immunantwort in vivo. Dazu sollte ein Maus-Modell etabliert werden, das es ermöglichen sollte, die durch die DNA-Vakzinierung induzierte Immunantwort zu beobachten und zu charakterisieren. Das Modellsystem sollte sowohl eine Charakterisierung der humoralen, als auch der T-zellulären Immunantwort ermöglichen. Im Rahmen dieses Modellsystems sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Einfluss systemischer Flt-3L-Applikation auf Expansion, Migration und Charakteristika von DCs, insbesondere myeloische oder lymphoide Marker
- Einfluss von Flt-3L auf die Antigen-spezifische proliferative Immunantwort nach DNA-Vakzinierung im  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassay
- Charakterisierung der T-zellulären Immunantwort durch die Untersuchung des Einflusses von Flt-3L auf die zytotoxische Immunantwort im  $^{51}\text{Cr}$ -Release-Assay und dem Nachweis von Antigen-spezifischen T-Zellen
- Einfluss der Flt-3L-Applikation auf die humorale Immunantwort, insbesondere auf die IgG-Subtypen im Serum vakzinierter Mäuse
- Charakterisierung der Immunantwort hinsichtlich  $\text{T}_\text{H}1$ - bzw.  $\text{T}_\text{H}2$ -Shift durch die Bestimmung des Zytokinprofils der Splenozyten vakzinierter Mäuse
- Charakterisierung der expandierten DCs, insbesondere hinsichtlich ihres Reifungszustandes

Diese Untersuchungen sollten dazu beitragen, die immunologische Wirkung von Flt-3L als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung im Hinblick auf zukünftige klinische Studien zu evaluieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Als "steril" oder "autoklaviert" bezeichnete Lösungen, wurden 20 min bei 120 °C und einem Druck von 2 bar behandelt. Als "sterilfiltriert" bezeichnete Lösungen wurden durch einen 0,22 µm Filter (Minisart®- oder Sartolab®-P) filtriert. Es wurde stets bidestilliertes Wasser („ddH<sub>2</sub>O“) verwendet.

#### 2.1.1 Chemikalien

	Bezugsquelle
Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Agarose for DNA-electrophoresis	Serva, Heidelberg
Ammoniumchlorid	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
Calcium-Chlorid	Sigma, Taufkirchen
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen
Cytology Lösung	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid, 10 mg/ml	Serva, Heidelberg
Fast Red Substrat (Sigma)	Sigma, Taufkirchen
Fötales Kälberserum FCS	Seromed Biochrom KG, Berlin
Glycerol (87 %), steril	Sigma, Taufkirchen
Hefe-Extrakt	Difco Laboratories, Detroit, USA
Isopropanol	Sigma, Taufkirchen
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin, 200 mM	Seromed Biochrom KG, Berlin

	Bezugsquelle
LPS	Sigma, Taufkirchen
MUP	Sigma, Taufkirchen
Na <sub>2</sub> <sup>51</sup> CrO <sub>4</sub> (5 µCi/ml)	Amersham, Buckinghamshire, UK
NaCl	Sigma, Taufkirchen
NaN <sub>3</sub>	Sigma, Taufkirchen
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Peroxidase Substrat (DAB)	Sigma, Taufkirchen
Propidiumiodid (PI)	BD, Heidelberg
RPMI 1640	Seromed Biochrom KG, Berlin
Streptavidin-AKP	BD, Heidelberg
Streptavidin-Peroxidase	Sigma, Taufkirchen
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Thymidin (1µCi/well)	Amersham, Buckinghamshire, UK
Tris (Trishydroxymethylaminoethane; Trisamine)	Ambion, Austin, USA
Triton X-100 0,2 %	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau 0,4 % (w/v)	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Tween-20	Sigma, Taufkirchen
Venimun	Behringwerke AG, Marburg

### 2.1.2 Puffer

**TE-Puffer**

10 mM Tris-HCL  
 1 mM EDTA  
 pH 7,6

**TAE-Puffer**

40 mM Tris/HCl  
 1 mM EDTA  
 20 mM Eisessig  
 pH 8,0

<b>PBS</b> (Invitrogen)	1 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 155 mM NaCl 3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,40
<b>TPBS</b>	PBS + 0,05 % Tween 20

**Puffer des Qiagen-Plasmid-Präparationskits (Qiagen, Hilden)**

Resuspensionspuffer P1	50 mM Tris/HCl 10 mM EDTA 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase-A pH 8,0
Lysepuffer P2	200 mM NaOH 1 % SDS
Neutralisierungspuffer P3	3 M Kaliumacetat, pH 5
Äquilibrierungspuffer QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Ethanol 0,15 % Triton X-100

Waschpuffer QC

1 M NaCl

50 mM MOPS, pH 7,0

15 % Ethanol

Elutionspuffer QF

1,25 M NaCl

50 mM Tris/HCl, pH 8,5

15 % Ethanol

### 2.1.3 Antikörper

Antikörper	Mark- ierung	Isotyp	Herkunft	Alias
CD11c	PE	Hamster IgG1, $\lambda$ 2	Pharminen	Integrin $\alpha_x$ chain
CD44	PE	Rat IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	Pharminen	Pgp-1, Ly-24
CD40	FITC	Rat IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	Pharminen	
CD80	FITC	Hamster IgG2, $\kappa$	Pharminen	B7-1
CD86	FITC	Rat IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	Pharminen	B7-2
CD11b	FITC	Rat IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	Pharminen	Integrin $\alpha_M$ chain
I-A <sup>b</sup>	FITC	Mouse IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	Pharminen	I-A <sup>b</sup> MHC class II Alloantigen
CD3	FITC	Rat IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	Pharminen	
CD8	PerCP	Rat IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	Pharminen	
CD62L	APC	Rat IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	Pharminen	L-selectin, LECAM-1, Ly-22

**Tab. 2-1:** Antikörper zur FACS-Analyse, **alle mausspezifisch**

## 2.1.4 Proteine, Peptide und Enzyme

**Restriktionsendonukleasen** (Fermentas, Ontario, Kanada)

**$\beta$ -Galactosidase** (Roche Applied Science, Mannheim)

**$\beta$ -Galactosidase-Peptid** (DAPIYTNV, Wita GmbH, Berlin)

**IL-7** (PeproTech, London, UK)

**Flt-3L** (zur Verfügung gestellt von Dr. Kathleen Picha, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA)

**GM-CSF** (PeproTech, London, UK)

## 2.1.5 Geräte und Material für die Molekularbiologie und Biochemie

**Calcium-Chlorid-Lösung**

50 mM CaCl<sub>2</sub>

1 mM Tris/HCl

pH 7,4

**6x Proben-Auftragspuffer**

0,25 % (w/v) Bromphenolblau (Serva)

0,25 % (w/v) Xylencyanol FF (Serva)

30 % Glycerol

in ddH<sub>2</sub>O

**DNA-Molekulargewichtsmarker** (Invitrogen): 1 Kb Plus DNA Ladder

**Spektrophotometer**

**Präzisionsküvetten** aus Suprasil<sup>®</sup>-Quarzglas

## 2.1.6 Medien für die prokaryontische Zellkultur

**LB-Medium**                      10 g Trypton (Difco, Detroit, USA)  
    5 g Hefe-Extrakt (Difco, Detroit, USA)  
    10 g NaCl  
    mit ddH<sub>2</sub>O auf 1l aufgefüllt, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt

**LB-Agar**                              LB-Medium mit 1,5 % Agar (Difco, Detroit, USA)

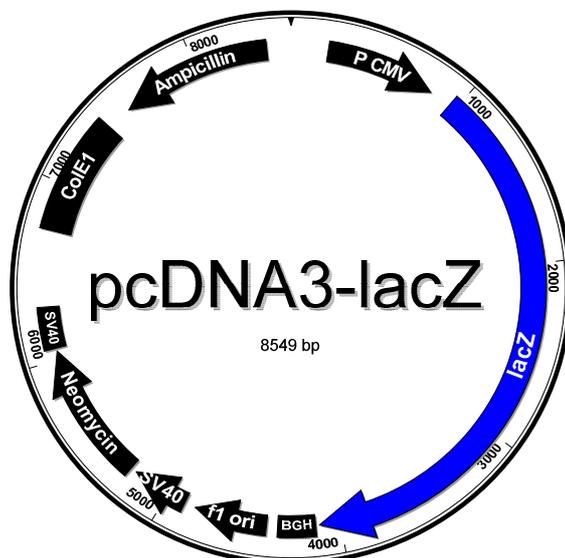
### Selektionsantibiotika

	Stammlösung	Konz. in Lösung	Konz. im Agar
Tetracyclin	12,5 mg/ml	10 µg/ml	
Ampicillin	100 mg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml

## 2.1.7 Plasmide

### pcDNA3-LacZ

Das pcDNA3-LacZ Plasmid kodiert für das bakterielle Enzym  $\beta$ -Galactosidase. Das Gen steht unter der Kontrolle des Cytomegalieviruspromotors (CMV-Promotors). Der Vektor trägt außerdem das Resistenzgen für Ampicillin (*amp<sup>r</sup>*) und einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1).



**Abb. 2-1: pcDNA-lacZ**  
 CMV Promotor: 209-863  
*lacZ* =  $\beta$ -Galactosidase-Gen: 963-4115  
 BGH Polyadenylierungssignal: 4137-4351  
 f1 Replikationsursprung: 4414-4827  
 SV40 Promotor und Replikationsursprung: 4892-5216  
 Neomycin Resistenzgen: 5252-6046  
 SV40 Polyadenylierungssignal: 6065-6303  
 ColE1 Replikationsursprung: 6735-7408  
 Ampicillin Resistenzgen: 7553-8413

## 2.1.8 Bakterienstämme

### E.coli XL1-Blue

Der E.coli-Stamm XL1-Blue zeichnet sich durch schnelles Wachstum und gute Transformierbarkeit (superkompetent,  $10^9$  Transformanten/ $\mu\text{g}$ ) aus. Die Herstellung der kompetenten E. coli XL1-Blue erfolgte nach der  $\text{CaCl}_2$ -Methode.

Der Stamm ist EcoK (HsdR) restriktionsdefizient, einklonierte DNA wird nicht durch das EcoK Endonukleasesystem herausgeschnitten. Zudem ist der Stamm endonukleasedefizient (endA1), was die Qualität der DNA bei Plasmidpräparationen erhöht, und rekombinationsdefizient (recA1), was die Stabilität von eingefügter DNA verbessert.

Genotyp von E.coli XL1-Blue (bei Stratagene erhältlich):

rec A1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup>ZAM15 Tn10 ('Tet') ]

## 2.1.9 Geräte und Material für die Zellkultur

Gewebekulturflaschen und -schalen

Kryoröhrchen

Hämocytometer nach Neubauer

Zellkulturflaschen (TPP, Trasadingen, Schweiz)

96-well Rundbodenplatten

Mikrotiterplatten mit rundem Boden (Costar, Bodenheim)

96-well Filterplatten

Zellharvester

Antibiotikallösung mit Penicillin, 10000 U/ml und Streptomycin, 10 mg/ml

Erythrozytenlysepuffer	Ammoniumchlorid 8,29 g Kaliumhydrogencarbonat 1,00 g EDTA-Natriumsalz 0,0372 g ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O, pH 7,3
RPMI 1640-Vollmedium	RPMI 1640 10 % FCS 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin
Einfriermedium	70 % RPMI 1640 20 % FCS 10 % DMSO

## 2.1.10 Material für immunologische Methoden

### Material für die FACS-Färbung

spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper (mAbs, s. Tabelle 2-1)

Antikörper Verdünnungs (AKV)-Medium	PBS 10 % Venimun 0,1 % NaN <sub>3</sub>
Färbepuffer	PBS 5 % FCS 0,05 % NaN <sub>3</sub>

FACS-Calibur-Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg)

„CellQuest“-Software (Becton Dickinson, Heidelberg)

**Material für die MACS-Zellaufreinigung**

Bindungspuffer            PBS  
                                  0,5 % BSA  
                                  2 mM EDTA

MACS Säulen

MACS Separatoren

**Material für den Chromrelease-Assay**

Szintillationsflüssigkeit

Szintillationszähler (TopCount, Packard Bio Science, Montréal, Québec, Kanada)

Feststoff-Szintillatorplatte (Packard)

**Material für die Immunzytologie**

Einbettungsmedium (Tissue Tek OCT, SAKURA, Torrance, CA, USA)

flüssiger Stickstoff

Kryostat

Blockierungspuffer        PBS  
                                  3 % BSA

biotinylierter anti-I-A<sup>b</sup> Antikörper (Pharmingen)

FITC-markierter anti-CD11c Antikörper (Pharmingen)

IgG-Isotyp (Pharmingen)

Streptavidin-Peroxidase (Sigma)

anti-Alkalische Phosphatase-FITC (Roche Applied Science)

Peroxidase Substrat DAB (Sigma)

Fast Red Substrat (Sigma)

"Cytology" Lösung (Merck)

Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg)

$\beta$ -Galactosidase 1  $\mu$ g/ml (Roche Applied Science) in PBS, pH 7,4

Waschpuffer TPBS (PBS + 0,05 % Tween-20)

Blockierungspuffer (0,5 % BSA (Fraktion V, Roth) in Waschpuffer mit 0,1 %  $\text{NaN}_3$ )

biotinylierte anti-Maus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3 (Pharmingen)

Streptavidin-AKP (Pharmingen)

MUP (Sigma)

### **IFN- $\gamma$ -Zytokinrelease-Assay**

Die Bestimmung der IFN- $\gamma$  Sekretion von T-Zellen erfolgte mit dem "IFN- $\gamma$  Secretion Assay - Cell Enrichment and Detection Kit" von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland):

Bindungsantikörper: Anti-mouse monoklonaler Zytokin-Antikörper

Detektionsantikörper: biotinylierter monoklonaler anti-mouse-Zytokin-Antikörper

Avidin-Meerrettich-Peroxidase Konjugat (HRP-Reagenz)

Rekombinante Zytokine als Standards

Bindungspuffer (0,1M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,5)

Waschpuffer TPBS (PBS + 0,05 % Tween-20)

Verdünnungsreagenz (PBS mit 10 % FCS, pH 7,0)

Substratlösung: TMB (Tetramethylbenzidin) und  $\text{H}_2\text{O}_2$

Stopplösung: 1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$

ELISA-Platten-Photometer (Perkin Elmer, Massachusetts, USA)

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Bakterienkultur

Zur Kultivierung der *E. coli* XL1-Blue in Flüssigkultur wurde LB-Medium mit Bakterien aus Glycerolkulturen angeimpft und dieses in Erlenmeyerkolben unter Schütteln inkubiert. Für die Anzucht der *E. coli* XL1-Blue in Petrischalen wurde LB-Agar verwendet. Die Flüssigkulturen und die Agarplatten wurden jeweils bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion wurden dabei die Antibiotika Tetracyclin bzw. Ampicillin zugesetzt. Tetracyclin wurde in einer Endkonzentration von 12,5 mg/l zugesetzt, Ampicillin in einer Konzentration von 100 mg/l.

### 2.2.2 Transformation von Bakterien

Bei der Transformation von Bakterien wird Fremd-DNA in Bakterien eingebracht, die zuvor mit Hilfe von  $\text{CaCl}_2$  kompetent gemacht wurden. Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit der Bakterienkultur angeimpft und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4 kultiviert. Dann wurde die Bakteriensuspension 10 min auf Eis inkubiert und bei 2500 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in einem halben Volumen  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Durch die salzarme Lösung wird die Zellmembran der Bakterien instabilisiert. Die Bakterien wurden erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und dann in einem Zehntel Volumen  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und mit 2,5 ml Glycerol versetzt. Diese Lösung kann aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt und zur Transformation aufgetaut werden. Zur Transformation wurden 1 bis 50 ng DNA mit 200  $\mu\text{l}$  kompetenten Bakterien gemischt. Die DNA sollte in maximal 10  $\mu\text{l}$  gelöst sein, da sonst Verunreinigungen die Transformationseffizienz beeinträchtigen.

Es wird 30 min auf Eis und anschließend 2 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert und die Bakterien wieder schnell auf Eis abgekühlt. Durch den Hitzeschock wird die Aufnahme der DNA durch die Bakterien begünstigt. Die Bakterien wurden mit 800 ml LB-Medium versetzt und 1h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zur Selektion auf transformierte Bakterien wurde das LB-Medium in verschiedenen Konzentrationen auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien wurden am nächsten Tag in Flüssigkultur

übergeimpft und ca. 18 h vermehrt und dann mittels Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse untersucht und Glycerolkulturen angefertigt.

### **2.2.3 Anlegen von Glycerolkulturen**

10 ml LB-Medium wurden mit dem gewünschten Bakterienstamm angeimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,5 bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 1,8 ml Glycerol (15 %) hinzugefügt und die Bakteriensuspension in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden bei -80 °C gelagert.

### **2.2.4 Plasmidpräparationen**

Der Plasmidpräparation liegt die Methode nach Birnboim und Doly zugrunde: Nach Anzucht der Bakterien im geeigneten Selektionsmedium werden die Bakterien durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und in Puffer resuspendiert, der RNase-A enthält. Dann wird eine alkalische Lyse mit NaOH/SDS durchgeführt. Dabei werden die Bakterienzellen vollständig denaturiert, d. h. alle Membranen, Zellkern und Organellen werden zerstört und sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNA wird freigesetzt. Durch den alkalischen pH-Wert wird die DNA denaturiert und dissoziiert in single strands. Die Plasmid-DNA dissoziiert ebenfalls in single strands, bleibt aber dadurch, dass das Plasmid ringförmig geschlossen ist, miteinander verbunden. Als nächstes wird ein Neutralisierungsschritt durchgeführt, bei dem die chromosomale DNA durch die schnelle Basenpaarung in einem dreidimensionalen Netzwerk reassoziert, während die Plasmid-DNA renaturiert. Durch die Hochsalzbedingungen fällt die chromosomale DNA zusammen mit dem SDS aus und kann von der Plasmid-DNA abzentrifugiert werden.

Für unsere Experimente wurde das endotoxinfreie Plasmidpräparationskit von Qiagen benutzt. Die Bakterien wurden pelletiert, in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, mit 10 ml Puffer P2 lysiert und mit 10 ml vorgekühlten Puffer P3 neutralisiert. Das Lysat wurde auf ein QIAfilter-Maxi-Cartridge aufgetragen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei flotiert das Präzipitat, das die genomische DNA, Proteine und SDS enthält. Das Lysat wurde durch das QIAfilter-Maxi-Cartridge in ein 50 ml Falcontube filtriert. 2,5 ml Puffer ER wurden dem gefilterten Lysat

hinzugefügt, gut gemischt und auf Eis 30 min inkubiert. Dann wurde das Lysat auf eine zuvor mit 10 ml QBT äquilibrierte Qiagen-tip 500-Säule aufgetragen. Die Säule wurde zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 15 ml Puffer QN eluiert. 10,5 ml Isopropanol wurden zugefügt und die DNA präzipitiert, indem 30 min bei 4 °C zentrifugiert (Rotor HB-4, 12500 rpm) wurde. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 2,5 ml endotoxinfreiem 70 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, die DNA 5-10 min luftgetrocknet und in 200 µl endotoxinfreiem TE-Puffer aufgenommen.

### **2.2.5 Konzentrationsbestimmung von RNA- und DNA-Lösungen**

DNA- und RNA-Lösungen absorbieren konzentrationsabhängig UV-Licht bei 260 nm. Eine Extinktion von 1 hat eine Doppelstrang-DNA-Lösung bei einer Konzentration von 50 µg/ml, eine Einzelstrang-RNA bei 40 µg/ml und Einzelstrang-Oligonukleotide bei einer Konzentration von 30 µg/ml. Bei 280 nm absorbieren außer den Nukleinsäuren auch Proteine und Phenol. Der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Qualität der DNA. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, kann bei höher konzentrierten DNA-Lösungen auch bei 1,6 bis 1,8 liegen.

### **2.2.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen vom Typ II spalten doppelsträngige DNA spezifisch an palindromischen Sequenzen, die für das jeweilige Restriktionsenzym charakteristisch sind. Sie erzeugen dabei je nach Restriktionsendonuklease entweder 5'- oder 3'-überhängende Enden einzelsträngiger DNA („sticky ends“) oder glatte Enden („blunt ends“). Dabei sind die optimalen Reaktionsbedingungen abhängig vom jeweiligen Restriktionsenzym. Analytische Verdau wurden mit 1 µg DNA durchgeführt. Es wurden 10 U Restriktionsenzym hinzugefügt und in dem entsprechenden Reaktionspuffer 1 bis 2 h bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Größenbereich von 0,5 - 15 kb eignen sich je nach Fragmentgröße 0,4 – 2 %-ige Agarose-Gele, die sowohl für analytische als auch präparative Auftrennungen verwendet werden können. Die aufzutragenden Proben wurden mit 6x Proben-Auftragspuffer versetzt und auf 10 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Probenauftragspuffer dient dazu die Dichte der Probe zu erhöhen und damit das Absinken der DNA in der Probentasche zu ermöglichen. Nach Auftragen der Proben und Marker wurde die Elektrophorese bei einer konstanten Feldstärke von 5 V/cm durchgeführt. Zur Färbung wurde das Gel für ca. 5 min in ethidiumbromidhaltigen TAE-Puffer (0,4 µg/ml) geschwenkt. Zur Dokumentation wurde das Gel mit Hilfe eines Videosystems unter Fluoreszenz-Anregung mit langwelligem UV-Licht (312 nm) fotografiert.

## **2.3 Zellbiologische Methoden**

### **2.3.1 Zelllinien**

#### **2.3.1.1 MC-57**

Bei der MC-57 Zelllinie handelt es sich um ein mit Methylcholanthren induziertes Fibrosarkom aus der Maus. MC-57 Zellen zeigen einen fibroblastischen Phänotyp und wachsen gleichmäßig adhärent als Einzellschicht in Zellkulturflaschen. Die MC-57 Zelllinie basiert auf dem genetischen Hintergrund der C57/BL6-Mäuse.

#### **2.3.1.2 MCA-205**

MCA205 ist ebenfalls ein schwach immunogenes methylcholanthren-induziertes Fibrosarkom auf dem Hintergrund von C57/BL6-Mäusen.

### **2.3.2 Zellkultur**

Alle Arbeitsschritte, die steril ablaufen müssen, wurden in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Medien und Puffer wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in einem Begasungs-Brutschrank (Heraeus).

### **2.3.3 Zellpassage**

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen wurden die in Kultur gehaltenen Zelllinien ein- bis dreimal pro Woche passagiert. Bei Adhäsionskulturen wurde dazu das alte Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, 2 ml Trypsin/EDTA zugegeben, nach Ablösung der Zellen wurden 5 ml Kulturmedium hinzugefügt. Die gewünschte Menge an Zellen wurde mit 15 ml frischem Medium versetzt.

### 2.3.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden 10 min bei 1300 rpm abzentrifugiert, ca.  $10^7$  Zellen in einem ml Einfriermedium resuspendiert und in sterile Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und dann im Kryobehälter langsam auf  $-80\text{ °C}$  eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden anschließend im Stickstofftank gelagert.

### 2.3.5 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen wurden möglichst schnell unter fließendem warmem Wasser aufgetaut, in 10 ml FCS-Medium überführt und zweimal mit FCS-Medium gewaschen, um das für die Zellen toxische DMSO zu entfernen.

### 2.3.6 Zellzahlbestimmung

Die Zelldichtebestimmung erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden wird Trypanblau eingesetzt, das die Zellmembran von toten Zellen passieren kann. Pro Eckquadrat wird von den Zellen in der Neubauerkammer ein Volumen von  $0,1\text{ mm}^3$  eingenommen.  $50\text{ }\mu\text{l}$  Zellsuspension wurden mit  $50\text{ }\mu\text{l}$  Trypanblau für maximal 10 min inkubiert, bei längerer Inkubation nehmen auch die lebenden Zellen langsam den Farbstoff auf. Die Zählkammer wurde mit einem Deckglas so bedeckt, daß Landolt-Ringe sichtbar waren, und mit der Zellsuspension befüllt. Es wurden vier große Eckquadrate ausgezählt. Der Mittelwert daraus entspricht der Zellzahl/ml multipliziert mit  $10^4$ .

## 2.4 Immunologische Methoden

### 2.4.1 Immunisierung von C57/BL6-Mäusen

Für die Immunisierungsexperimente wurden weibliche 8 bis 12 Wochen alte C57/BL6(H-2k<sup>b</sup>) Mäuse verwendet, die von Charles River erworben wurden. Die Tierversuche waren genehmigt vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi), Projekt-Nr. 188/92-49.

Zur Untersuchung der Immunantwort im Mausmodell wurden die C57/BL6-Mäuse mit  $\beta$ -Galactosidase-kodierenden Plasmiden vakziniert. Dazu wurde den C57/BL6-Mäusen entweder einmalig oder mit Boosterung nach 3 Wochen entsprechend der im Ergebnisteil beschriebenen Vakzinierungsschemata jeweils 100  $\mu$ g Plasmid-DNA intramuskulär injiziert. Zur Austestung der effektivsten Vakzinationsstelle wurden die Tiere an unterschiedlichen Lokalisationen, i.m., s.c. und f.p. vakziniert und danach die Stärke der Immunantwort mittels Proliferationsassay untersucht. Entsprechend den Vakzinierungsschemata wurden die Mäuse vor und nach der Vakzinierung mit 10  $\mu$ g rekombinantem Flt-3L (Amgen Inc., CA, USA) pro Maus und Tag behandelt (s.c.).

### 2.4.2 Präparation von Splenozyten

14 Tage nach der letzten Vakzinierung wurden die Mäuse getötet und die Milzen steril explantiert. Es wurde eine Einzelzellsuspension in Kompletmedium erstellt und die Erythrozyten mittels Erythrozytenlysepuffer entfernt. Die Splenozyten wurden zweimal mit Medium gewaschen und dann in die im folgenden beschriebenen immunologischen Assays eingesetzt.

## **2.4.3 Präparation von Dendritischen Zellen**

### **2.4.3.1 Präparation von DCs aus Splenozyten**

Die wie oben beschrieben gewonnenen Splenozyten wurden für 2 bis 3 h in Kulturflaschen im Brutschrank inkubiert, wobei die DCs an der Plastikoberfläche adhäreren, während B- und T-Zellen in Suspension bleiben. Der Suspensionsüberstand wurde verworfen, die adhärenen Zellen wurden in Kompletmedium mit 10 ng/ml GM-CSF und 25 ng/ml LPS über Nacht im Brutschrank weiter inkubiert und anschließend für die FACS-Analyse verwendet.

### **2.4.3.2 Präparation von DCs aus Knochenmark**

Die Knochenmarkszellen wurden aus Femur und Tibia präpariert, in Kompletmedium aufgenommen und in Sechswell-Platten verteilt für 2 bis 3 h im Brutschrank inkubiert. Die nicht adhärenen Zellen wurden in neue Kulturplatten überführt und mit Kompletmedium, das 10 ng/ml GM-CSF enthielt, über Nacht inkubiert. Die nicht-adhärenen Zellen wurden am nächsten Tag verworfen und die adhärenen Zellen weiterhin mit 10 ng/ml GM-CSF in Kompletmedium inkubiert. Am Tag zwei wurde der Überstand mit den nicht-adhärenen Zellen erneut verworfen. Am Tag 5 und 7 wurde jeweils 1 ml Medium mit 10 ng/ml GM-CSF hinzugefügt. Um die DCs auszureifen, wurde am Tag 7 LPS in einer Konzentration von 25 ng/ml zugegeben. Am Tag 8 konnten die reifen nicht adhärenen DCs zur FACS-Analyse eingesetzt werden.

## 2.4.4 FACS-Analyse

Bei der Durchflußzytometrie (*Fluorescence activated cell sorting analysis*; FACS-Analyse) werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom analysiert. Obwohl die Messrate bei einigen tausend Zellen pro Sekunde liegt, wird jede Zelle einzeln analysiert. Mit Hilfe dieser Methode können verschiedene Parameter einer Zelle gleichzeitig bestimmt werden, so dass es möglich ist, verschiedene Zelltypen aus einem Gemisch von Zellen zu quantifizieren und zu isolieren. Dazu wird aus lebenden oder fixierten Zellen eine Einzelzellsuspension hergestellt.

Im FACS-Gerät passiert die Suspension als Tropfen-Strom einen Laser-Strahl. Jede Zelle streut das Laserlicht und emittiert durch die Anregung Fluoreszenzlicht.

Gleichzeitig werden dabei folgende Parameter bestimmt:

- Vorwärts-Streuung (*forward-scatter*): liefert Informationen über die Zellgröße
- seitliche Streuung (*side-scatter*, 90°): liefert Informationen zur Granularität zellulärer Strukturen
- Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Wellenlängen

Mit Hilfe der Lichtstreuung können Zelltod, Zellaggregationen und Zelleigenfluoreszenz vom Fluoreszenzlicht unterschieden werden. Die Streuung reicht beispielsweise aus, um Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten aus Gesamtblut-Leukozytenproben zu isolieren. Ebenso können Zellen, die mit spezifischen, an Fluoreszenz-Farbstoffe gekoppelten Antikörpern markiert sind, quantifiziert und getrennt werden, womit z. B. Rückschlüsse auf Dichte von Oberflächenproteinen gezogen werden können. Ebenso ist die Detektion von verschiedenen fluoreszierenden Proteinen (GFP, CyanFP, RFP) oder Gesamtzell-DNA (Zellzyklus-Abhängigkeiten; Apoptose-Analyse) möglich.

Die Zellen wurden bei Bedarf trypsinisiert, pelletiert und in ca. 500 µl PBS resuspendiert, es wurden maximal  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in spezielle FACS-Röhrchen (Becton Dickinson) überführt. Vor der Messung wurden die Zellen auf Eis gelagert. Durch den Vergleich mit Positiv- und Negativ-Kontrollen wurden die Detektionskanäle optimiert, anschließend wurden die Proben durchgemessen, wobei mindestens 20.000 Ereignisse gezählt wurden.

### 2.4.5 Fluoreszenzfärbung der Zellen

Zur Fluoreszenzfärbung wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 50  $\mu\text{l}$  Färbepuffer resuspendiert und mit 100  $\mu\text{g/ml}$  AKV (10  $\mu\text{l}$ ) für 20 min auf Eis geblockt. Zellen murinen Ursprungs wurden mit Mausserum blockiert. Die Zellen wurden mit 200  $\mu\text{l}$  eiskaltem Färbepuffer gewaschen (1500 rpm, 4 °C, 5 min) und in 100  $\mu\text{l}$  Färbepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  fluoreszenzmarkiertem Antikörper wurde 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit 200  $\mu\text{l}$  eiskaltem Färbepuffer gewaschen (1500 rpm, 4 °C, 5 min), in 300  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert und im FACS-Calibur (Becton Dickinson) analysiert.

### 2.4.6 IFN- $\gamma$ -Sekretionsassay

Interferon- $\gamma$  ist ein Zytokin, das hauptsächlich von aktivierten CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen sezerniert wird. Der IFN- $\gamma$  Sekretionsassay kann dazu verwendet werden, Antigen-spezifische T-Zellen zu isolieren und zu analysieren. Als Ausgangsmaterial hierfür können Blut, PBMCs oder auch Zellpräparationen mit Leukozyten dienen. Die entsprechenden T-Zellen werden mit dem spezifischen Peptid, Protein oder Antigen restimuliert. Die Zellen werden kurze Zeit bei 37 °C inkubiert, um die Zytokinsekretion zu erlauben. Das sezernierte IFN- $\gamma$  wird durch das IFN- $\gamma$ -Bindungsreagenz auf der Oberfläche der IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen fixiert und erlaubt somit die Identifikation einzelner IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen. Diese Zellen werden mit einem zweiten IFN- $\gamma$ -spezifischen Antikörper, dem IFN- $\gamma$ -Detektionsantikörper, der mit R-Phycoerythrin (PE) konjugiert ist, markiert und in der FACS-Analyse identifiziert. Die Zellen können zusätzlich über magnetische Microbeads, die an Anti-PE-Antikörper gekoppelt sind, angereichert und aufgereinigt werden, um für weitere Analysen oder Experimente zur Verfügung zu stehen.

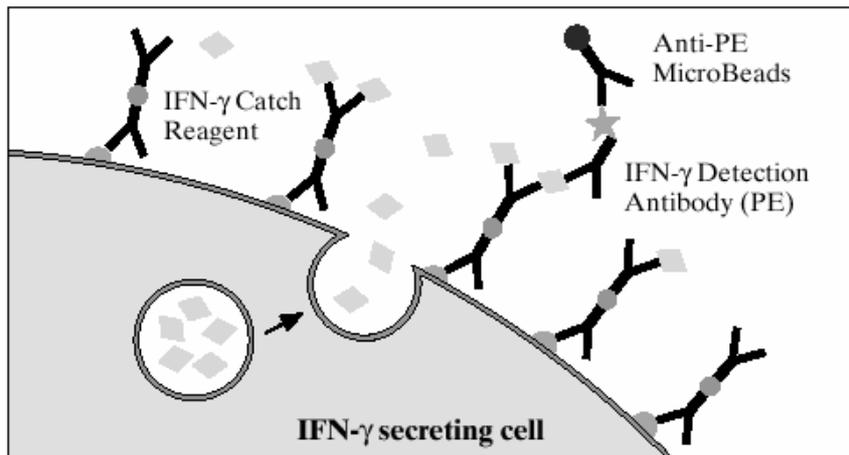


Abb. 2-2: Prinzip des IFN- $\gamma$ -Sekretionsassay

Der Nachweis von Antigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Zellen erfolgte mit Hilfe des IFN- $\gamma$ -Sekretionsassay von Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland). Zur Antigen-spezifischen Restimulation *in vitro* wurden  $2 \times 10^7$  Zellen der Milzzellsuspensionen mit 10  $\mu\text{g/ml}$   $\beta$ -Galactosidase für 24 h in Vollmedium bei 37 °C inkubiert. Als Referenz wurde ein Teil der Zellen ohne Protein inkubiert. Zur Markierung der Zellen mit IFN- $\gamma$ -Bindungsreagenz wurden die Zellen mit kaltem Puffer gewaschen, mit 300 g bei 4 °C für 10 min. zentrifugiert und das Zellpellet in 90  $\mu\text{l}$  kaltem Medium aufgenommen. 10  $\mu\text{l}$  IFN- $\gamma$ -Bindungsreagenz wurde zugegeben und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 37 °C warmen Mediums wurde während der IFN- $\gamma$ -Sekretionsperiode unter Rotation 45 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden mit IFN- $\gamma$ -Detektionsantikörper markiert, indem nach Waschen mit 2 ml kaltem Puffer 10  $\mu\text{l}$  IFN- $\gamma$ -Detektionsantikörper (PE) zugegeben wurde. Nach Waschen der Zellen mit kaltem Puffer wurden 20  $\mu\text{l}$  Anti-PE-MicroBeads pro  $10^7$  Zellen zugegeben, gut geschüttelt und für 15 Minuten bei 4 – 8 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde nach erneutem Waschen auf eine MACS-Säule im MACS-Separator aufgetragen. Die Säule wurde dreimal mit 500  $\mu\text{l}$  kaltem Puffer gewaschen und nach dem Entfernen der Säule aus dem Separator wurden die angereicherten Zellen mit kaltem Puffer aus der Säule herausgespült. Die Zellen wurden zusätzlich mit CD4-FITC bzw. CD8-FITC gefärbt. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen gewaschen und im FACS-Calibur gemessen. Tote Zellen wurden durch Zugabe von Propidiumiodid (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) direkt vor der Messung ausgeschlossen.

### 2.4.7 Proliferationsassay

Die proliferative Immunantwort von T- und B-Zellen nach spezifischer Antigenstimulation wurde mit Hilfe eines [<sup>3</sup>H]Thymidin-Proliferationsassays untersucht. Dazu wurden die aus den vakzinierten Mäusen entnommenen Milzzellkulturen zunächst *in vitro* für eine bestimmte Zeit mit rekombinanter  $\beta$ -Galactosidase als Antigen restimuliert. Durch die Restimulation beginnen die B-Zellen zunächst zu proliferieren, später werden spezifische Ig-Antikörper gebildet. Durch den Einbau des radioaktiv-markierten Thymidins in die neusynthetisierte DNA kann das Ausmaß der Proliferation bestimmt und die Immunantwort quantifiziert werden.

$10^5$  Zellen wurden in 200  $\mu$ l Komplettmedium in einer 96-well-Rundbodenplatte fünf Tage bei 37 °C restimuliert. Es wurden jeweils Triplikate mit und ohne  $\beta$ -Galactosidase inkubiert, unterschiedliche  $\beta$ -Galactosidasekonzentrationen (1, 5, 10 und 50  $\mu$ g/ml) wurden verglichen (s. Ergebnisteil). Am vierten Tag wurde 1  $\mu$ Ci <sup>3</sup>H-Thymidin pro well zugegeben und die Zellen für weitere 18 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellharvesters auf 96-well-Filterplatten abgesaugt, wodurch freies, nicht in die DNA inkorporiertes <sup>3</sup>H-Thymidin ausgewaschen wurde. Die Filterplatten wurden dreimal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 50  $\mu$ l Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler gemessen. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde der Median der Triplikate herangezogen.

### 2.4.8 Chromium-Release-Assay

Im <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest werden Zellen mit Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> inkubiert. Das CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Anion gelangt durch spezifische Ionenkanäle in die Zelle und wird dort durch Glutathion zu Cr III reduziert. Cr III gelangt in den Zellkern und bindet dort an die DNA. Wird eine Zielzelle von zytotoxischen T-Zellen erkannt und lysiert werden die intrazellulären Bestandteile freigesetzt. Das radioaktiv-markierte Cr III kann im Überstand der Lösung nachgewiesen werden (Brunner *et al.* 1968).

Als Target-Zellen für die zytotoxische Immunantwort dienten MC-57 Zellen, die mit 10  $\mu$ g/ml  $\beta$ -Galactosidase-Peptid (DAPIYTNV, Wita GmbH, Berlin) gepulst worden waren. Die Zellen wurden in Medium mit Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> überführt und 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit RPMI-Medium gewaschen. Als Effektorzellen dienten Splenozyten, die fünf Tage

mit 5 µg/ml β-Galactosidase-Peptid und 10 U/ml IL-7 restimuliert worden waren. Die Effektorzellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (s. Ergebnisteil) mit den <sup>51</sup>Cr-markierten Target-Zellen für 4 h bei 37 °C inkubiert. 50 µl des Kulturüberstandes wurden auf Feststoff-Szintillatorplatten übertragen, für 45 min bei 60 °C getrocknet und anschließend im gamma-Zähler ausgezählt. Die maximale Freisetzung wurde bestimmt indem die Target-Zellen mit 0,2 % Triton X-100 lysiert wurden, die spontane Freisetzung wurde nach Inkubation der Target-Zellen in RPMI-Medium bestimmt. Als Positivkontrolle diente die Immunisierung der Mäuse mit der Zelllinie MCA205/B7/β-Gal [1].

Alle Werte wurden als Triplikate ermittelt. Die spezifische Lyse wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

**Prozentsatz der spezifischen Lyse =**

$$\frac{(\text{cpm-Wert der Probe} - \text{Spontanfreisetzung})}{(\text{cpm-Wert der maximalen Freisetzung} - \text{Spontanfreisetzung})}$$

## 2.4.9 Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie lässt sich in Geweben und auch auf Einzelzellen eine Vielzahl von Antigenen spezifisch nachweisen. Durch Kombination mehrerer Verfahren lassen sich auch Doppelmarkierungen mehrerer Antigene auf der gleichen Zelle mit verschiedenen Farben realisieren. Dazu sind zwei für die unterschiedlichen Antigene spezifische Primärantikörper notwendig, die an Enzyme gekoppelt sind, die unterschiedliche Farbreaktionen ermöglichen oder die die Bindung an unterschiedliche Sekundärantikörper ermöglichen, die ihrerseits verschiedene Farbreaktionen katalysieren oder zum Beispiel an Gold oder andere sichtbare Partikel gekoppelt sind. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Brückenantikörpern die Primär- und Sekundärantikörper verknüpfen. Für unsere Fragestellung wurde eine Doppel-Immunmarkierung mit anti-I-A<sup>b</sup>- und anti-CD11c-Antikörpern durchgeführt.

Die Mausmilzen wurden in OCT-Einbettungsmedium in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Kryoschnitte wurden mit Aceton fixiert und in Blockierungspuffer (PBS mit 3 % BSA) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren. Die Primärfärbung erfolgte mit biotinyliertem anti-I-A<sup>b</sup>-Antikörper bzw. FITC-markiertem

anti-CD11c-Antikörper. Zur Sekundärfärbung wurde mit Streptavidin-Peroxidase bzw. anti-Alkalische Phosphatase-FITC inkubiert. Als Substrate wurden Peroxidase Substrat bzw. Fast Red Substrat zugegeben. Die Zellkerne wurden mit "Cytology"-Lösung angefärbt und die Kryoschnitte im Mikroskop fotografiert.

## 2.4.10 ELISA

ELISA steht für Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Den ELISA gibt es in vielen verschiedenen Variationen, allen gemeinsam ist, dass Antigen oder auch Antikörper, die an eine feste Phase gekoppelt sind, Antikörper oder Antigene aus einer flüssigen Phase binden und diese in einer zweiten Reaktion sichtbar gemacht werden.

### 2.4.10.1 ELISA auf IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3-Serum-Antikörper

Sowohl dem ELISA für die Bestimmung der IgG-Antikörper, als auch dem ELISA zur Konzentrationsbestimmung der Zytokine liegt ein sogenannter Festphasen-Sandwich-ELISA zugrunde. Dabei wird ein an 96-well-Platten gebundener für das jeweilige IgG spezifischer Antikörper verwendet, der das IgG aus der Probe an die 96-well-Platte bindet. Dann wird ein zweiter für ein anderes Epitop des gleichen IgG spezifischer biotinylierter Antikörper zugegeben, der mit Hilfe einer Farbreaktion sichtbar gemacht und photometrisch ausgewertet werden kann.

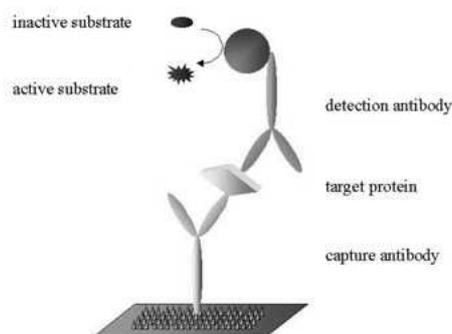


Abb. 2-3: Prinzip des Festphasen-Sandwich-ELISA

96-well Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit 100 µl β-Galactosidase-Lösung (1 µg/ml) beschichtet. Die wells wurden mit TPBS-Waschpuffer gewaschen und über Nacht mit 250 µl Blockierungspuffer inkubiert. Am folgenden Tag wurde zweimal mit TPBS-Waschpuffer gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit 100 µl von einer Serumverdünnungsreihe (1:30, 1:60, 1:120, 1:240) in TPBS inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit TPBS-Puffer wurden die Platten für 1 h mit 100 µl einer 1:1000 Verdünnung der jeweiligen biotinylierten anti-Maus-IgG-Antikörper inkubiert. Die 96-well-Platten wurden viermal mit TPBS-Waschpuffer gewaschen, dann mit 100 µl einer 1:1000 Verdünnung von Streptavidin-AKP für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden gewaschen und mit 200 µl MUP pro well versetzt. Nach 1 h wurden die Platten im ELISA-Platten-Reader ausgewertet.

#### **2.4.10.2 ELISA auf IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 und γ-IFN-Sekretion**

Zur Analyse der Zytokinkonzentration von IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 und γ-IFN in Zellkulturüberständen von gepoolten Milzzellkulturen wurden ELISA-Kits von Pharmingen verwendet. Alle Konzentrationsbestimmungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die 96-well Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit Zytokin-Bindungsantikörper inkubiert. Die wells wurden dreimal mit TPBS-Waschpuffer gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur mit 250 µl Verdünnungsreagenz blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit TPBS-Waschpuffer wurde 100 µl Probenlösung bzw. 100 µl Standard zugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Es wurde fünfmal mit TPBS-Waschpuffer gewaschen und 100 µl Detektionslösung (Detektionsantikörper mit HRP-Reagenz) pro well hinzugeben und für 1 h bei RT inkubiert. Die wells wurden siebenmal mit TPBS-Waschpuffer gewaschen und 100 µl Substratlösung pro well zugegeben und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Stopplösung pro well wurden die Platten im ELISA-Platten-Reader bei 450 nm ausgewertet.

## 2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Aufbereitung der Daten erfolgte nach Übertragung in eine Excel-Tabelle (Microsoft Office Excel 2003 SP2, Microsoft Corp., Redmond, USA). Mittels deskriptiver Statistik wurden statistische Kenngrößen wie Mittelwert, Standardabweichung und Median berechnet. Die Mittelwerte unabhängiger Stichproben wurden auf Signifikanzunterschiede unter Annahme einer Normalverteilung mit Hilfe des t-Tests für zwei unverbundene Stichproben überprüft (Studentsche t-Verteilung, [167]). Alle p-Werte sind zweiseitig angegeben und wenn nicht anders aufgeführt handelt es sich immer um Angaben des Mittelwertes  $\pm$  Standardabweichung. Ein Unterschied wurde als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit bei  $p < 0,05$  lag.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expansion dendritischer Zellen mit Flt-3L in vivo

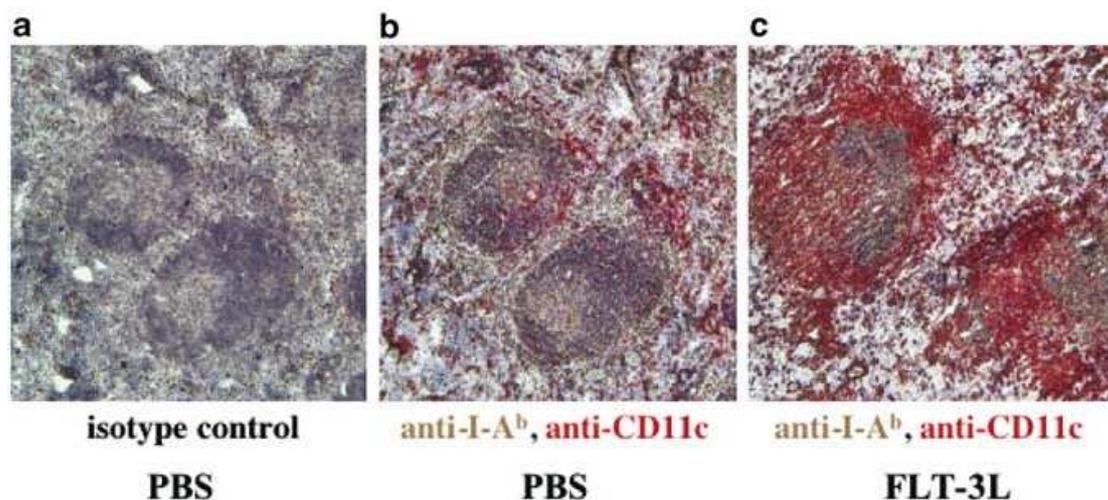
Die Expansion von dendritischen Zellen durch Flt-3L in vivo wurde an C57/BL6-Mäusen untersucht, denen über einen Zeitraum von zwölf Tagen täglich 10 µg Flt-3L subkutan injiziert worden war. Die Milzen der Tiere wurden steril explantiert, in Einzelzellsuspension überführt und immunhistochemisch bzw. mittels FACS-Analyse charakterisiert.

Die Milzen der mit Flt-3L behandelten Mäuse zeigten im Vergleich zu den Milzen der mit PBS behandelten Kontrollmäuse bereits makroskopisch eine Vergrößerung um ca. 20 %. Die Zahl der Splenozyten, die aus den mit Flt-3L behandelten Mäusen isoliert wurden, war um den Faktor drei bis vier höher als die der Kontrollmäuse.

#### 3.1.1 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung der Milzen

Zur immunhistochemischen Färbung der Splenozyten wurden Antikörper gegen MHC-Klasse II-Moleküle (anti-I-A<sup>b</sup>) und gegen CD11c verwendet.

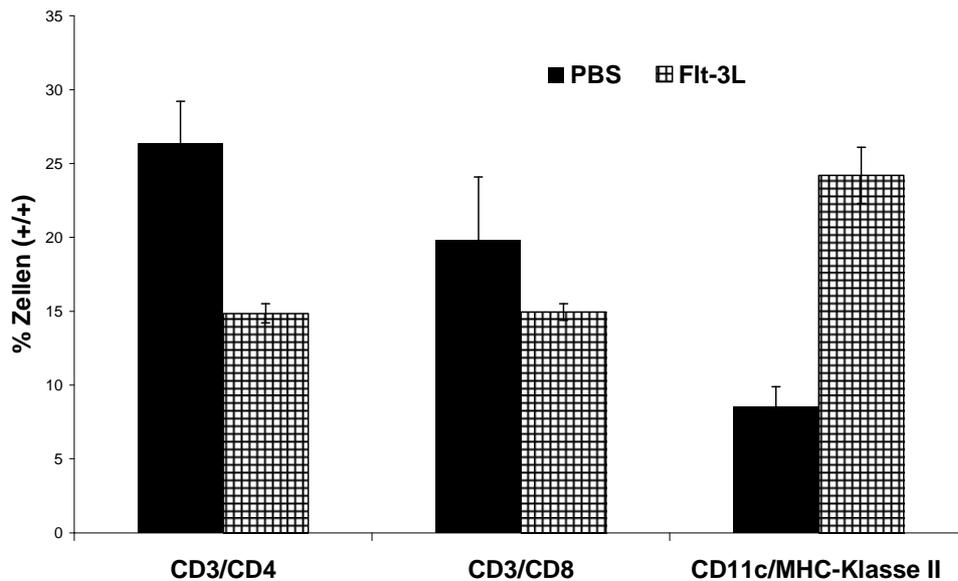
MHC-Klasse II-Moleküle werden auf B-Lymphozyten, DCs und Makrophagen exprimiert, während CD11c in der Maus spezifisch auf dendritischen Zellen exprimiert wird. Bei den mit Flt-3L behandelten Mäusen zeigte sich eine deutliche Zunahme der CD11c-gefärbten Zellen im Vergleich zu den Kontrollmäusen.



**Abb. 3-1:** Immunhistochemische Färbung von Milzen aus Flt-3L und PBS behandelten C57/BL6 Mäusen nach der „Fast Red Substrat“-Methode (Dako); **a:** Isotypkontrolle; **b:** anti-I-A<sup>b</sup>(braun) und anti-CD11c(rot), PBS behandelte Mäuse; **c:** anti-I-A<sup>b</sup> und anti-CD11c, Flt-3L-behandelte Mäuse;

### 3.1.2 In-Vivo-Applikation von Flt-3L

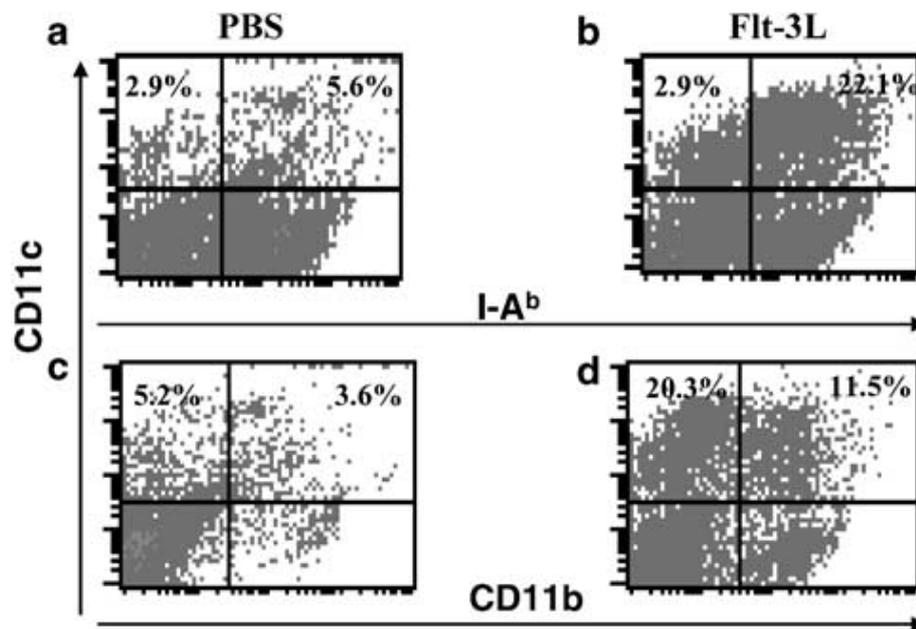
Um den prozentualen Anteil an T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen und DCs in den Milzen der mit Flt-3L bzw. mit PBS behandelten Mäusen zu bestimmen, wurden durchflusszytometrische Doppelfärbungen mit CD3/CD4, CD3/CD8 und CD11c/anti-I-A<sup>b</sup> durchgeführt.



**Abb. 3-2:** Doppelfärbung von Splenozyten auf den Phänotyp von T-Helferzellen (CD3/CD4), von zytotoxischen T-Zellen (CD3/CD8) und von DCs (CD11c/anti-I-A<sup>b</sup>). Die Mäuse wurden zuvor mit Flt-3L bzw. PBS behandelt. Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil der doppelt positiven Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von dreien. Flt-3L steigerte den Anteil dendritischer Zellen um den Faktor 2,8 ( $p=0,02$ ).

In den Flt-3L-behandelten Mäusen wurden deutlich mehr DCs gefunden als in den mit PBS behandelten Kontrollmäusen, die Zahl der CD11c/Klasse II doppelt positiven Zellen steigt auf das dreifache (24,2 % versus 8,5 %,  $p=0,02$ ). Der Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist in den Milzen der Flt-3L-behandelten Mäusen um den Faktor 0,6 niedriger (14,9 % versus 26,4 %,  $p=0,06$ ), der Anteil CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist geringfügig um den Faktor 0,8 niedriger (15,0 % versus 19,8 %, nicht signifikant). Dies könnte auf die erhöhte Gesamtzellzahl in den Milzen der Flt-3L-behandelten Mäuse zurückzuführen sein.

Zur Differenzierung der myeloischen und lymphoiden Subtypen der DCs diente der Oberflächenmarker CD11b. Während die myeloischen dendritischen Zellen das auch von Makrophagen gebildete Integrin CD11b exprimieren, zeigen die lymphoiden dendritischen Zellen die  $\alpha$ -Kette von CD8 auf ihrer Zelloberfläche [2].



**Abb. 3-3:** FACS-Färbungen zur Unterscheidung von myeloischen und lymphoiden DCs. **A:** PBS behandelte Kontrollmäuse, die Splenozyten wurden auf CD11c und anti-I-A<sup>b</sup> gefärbt. **B:** Flt-3L behandelte Mäuse, Färbung mit CD11c und anti-I-A<sup>b</sup>. **C:** PBS behandelte Mäuse, Färbung auf CD11c, CD11b **D:** Flt-3L behandelte Mäuse, Färbung auf CD11c, CD11b

Die Milzzellsuspension der PBS behandelten Kontrollmäuse enthielt 8,8 % CD11c<sup>+</sup> Zellen, wovon 3,6 % CD11b<sup>+</sup> und 5,2 % CD11b<sup>-</sup> waren. Nach Behandlung mit Flt-3L waren 31,8 % der Zellen CD11c<sup>+</sup> und 22,1 % doppelt-positiv für CD11c und I-A<sup>b</sup>. Von den 31,8 % CD11c<sup>+</sup> Zellen waren 11,5 % CD11b<sup>+</sup> und 20,3 % CD11b<sup>-</sup>. Flt-3L expandierte somit sowohl DCs lymphoiden als auch myeloischen Ursprungs, hatte jedoch einen um den Faktor 1,8 stärkeren Einfluss auf die Expansion lymphoider DCs.

### 3.2 Einfluss von Flt-3L auf die Immunantwort in vivo

Um die immunologische Funktion der in vivo expandierten DCs und deren Einfluss auf Vakzinierung und Immunantwort zu charakterisieren, wurde ein Mausmodell mit  $\beta$ -Galactosidase als Antigen etabliert. C57/BL6-Mäuse wurden im Abstand von 3 Wochen zweimal mit 100  $\mu$ g Plasmid-DNA (pcDNA3-lacZ) vakziniert, das bakterielle  $\beta$ -Galactosidase unter einem CMV-Promotor exprimiert. Einer Gruppe der Mäuse wurde über einen Zeitraum von 13 Tagen während der ersten und zweiten Vakzinierung Flt-3L injiziert. Zwei Wochen nach der zweiten Vakzinierung wurde den Mäusen die Milzen entnommen, in Einzelzellsuspensionen überführt und in verschiedenen immunologischen Assays untersucht.

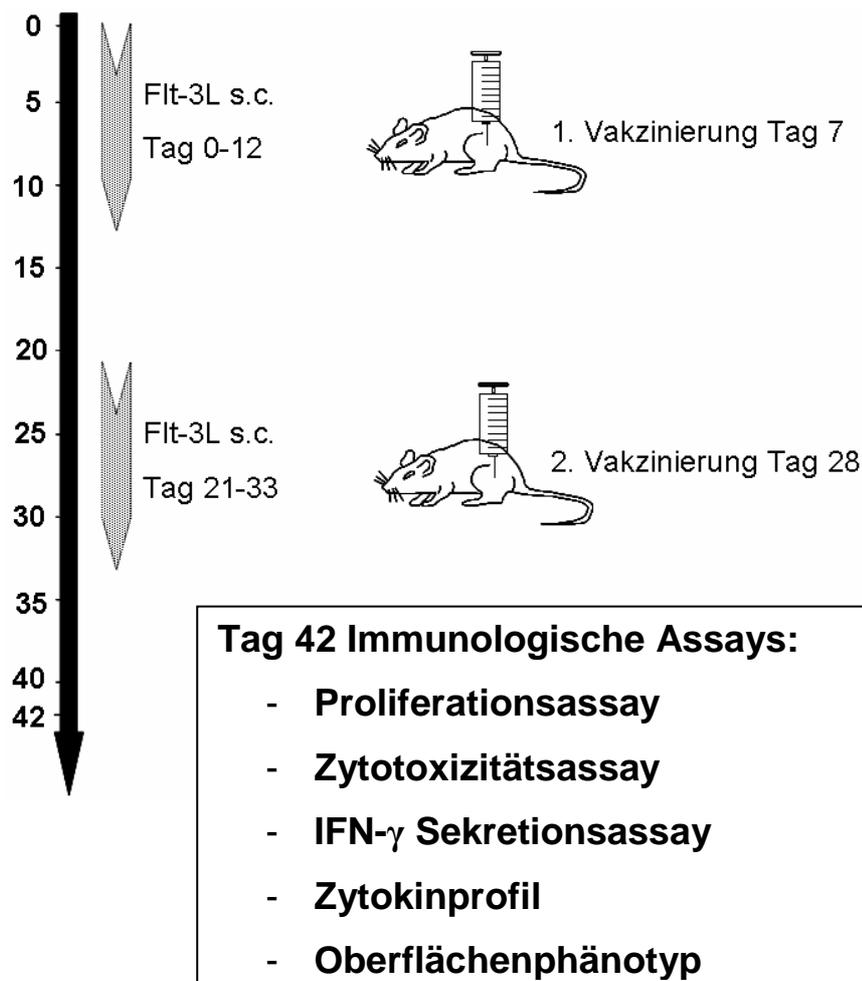
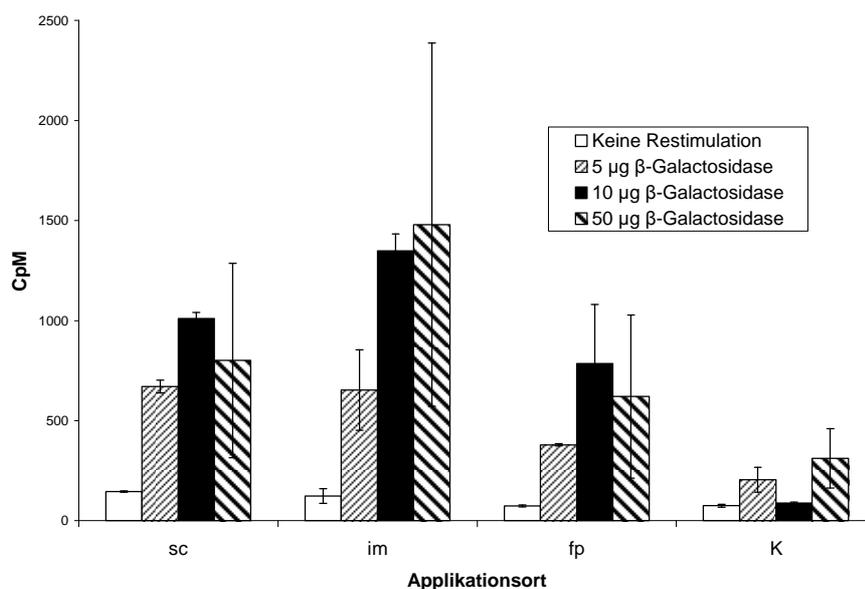


Abb. 3-4: Experimenteller Aufbau der Vakzinierungsexperimente

### 3.2.1 Optimierung der DNA-Vakzinierung und des Proliferationsassays

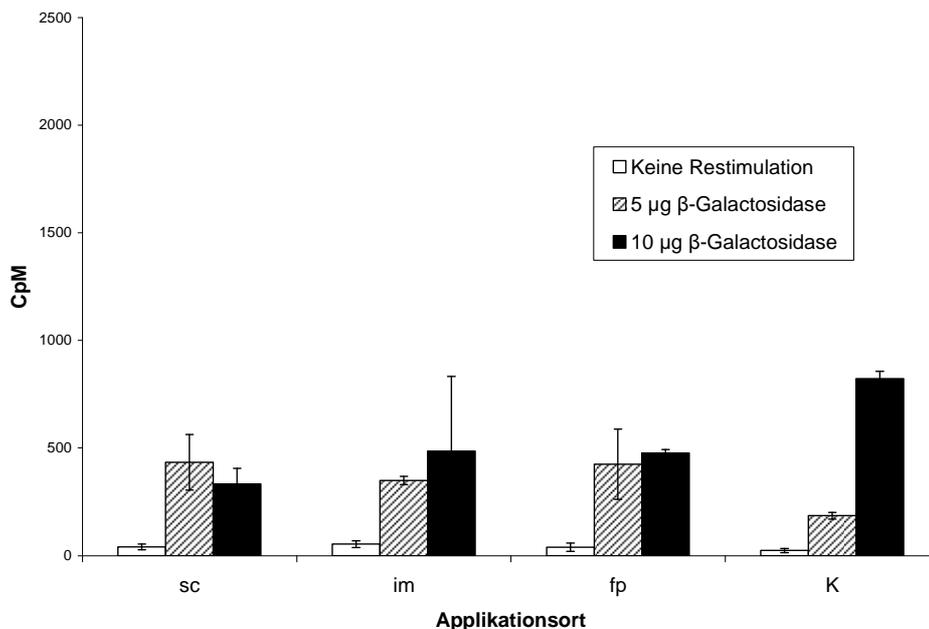
Zur Optimierung des Applikationsweges wurden Mausgruppen von jeweils zwei Mäusen mit 100 µg pcDNA3-lacZ an unterschiedlichen Applikationsorten vakziniert. Zwei Wochen später wurde den Mäusen zur Boosterung nochmals die gleiche Menge Plasmid-DNA injiziert. Als alternative Applikationswege wurden die subkutane Injektion (s.c.), die intramuskuläre Injektion (i.m.) und die Injektion in die Pfote (f.p.) gewählt. An Tag 30 des Experiments wurden die Mäuse getötet, die Milzen entnommen und in Einzelzellsuspensionen überführt. Um die bestmöglichen Konditionen im Proliferationsassay zu evaluieren, wurden die Splenozyten in verschiedenen Medien mit unterschiedlicher Menge  $\beta$ -Galactosidase-Protein über drei oder fünf Tage restimuliert.

Die Splenozyten wurden entweder in FCS-haltigem RPMI-Medium oder alternativ in X-Vivo-Medium kultiviert. Es wurden 5, 10 oder 50 µg/ml  $\beta$ -Galactosidase zugesetzt. Am zweiten bzw. vierten Tag der Restimulation wurde die Antigen-spezifische Proliferation mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassay bestimmt. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Protein (Negativkontrolle) und Ansätze mit Zusatz von PHA (Phytohämagglutinin) kombiniert mit IL-2 zur maximalen Stimulation der Proliferation (Positivkontrolle). PHA ist ein in Pflanzen vorkommendes hämagglutinierendes Globulin (Lectin), das auf Lymphozyten mitogene Wirkung zeigt. IL-2 wirkt über den IL-2-Rezeptor als T-Zellwachstumsfaktor, stimuliert aber auch die B-Zellproliferation.

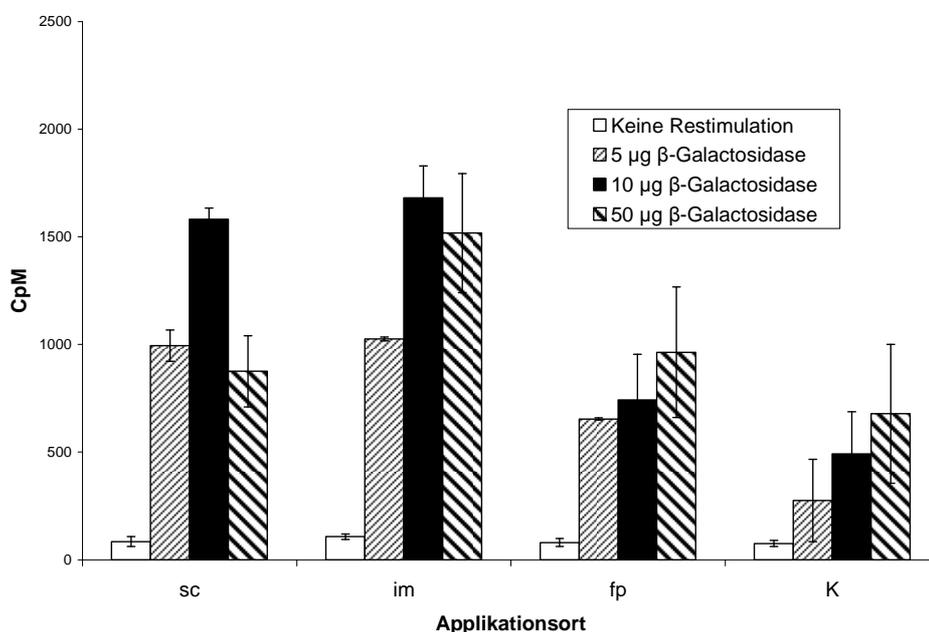


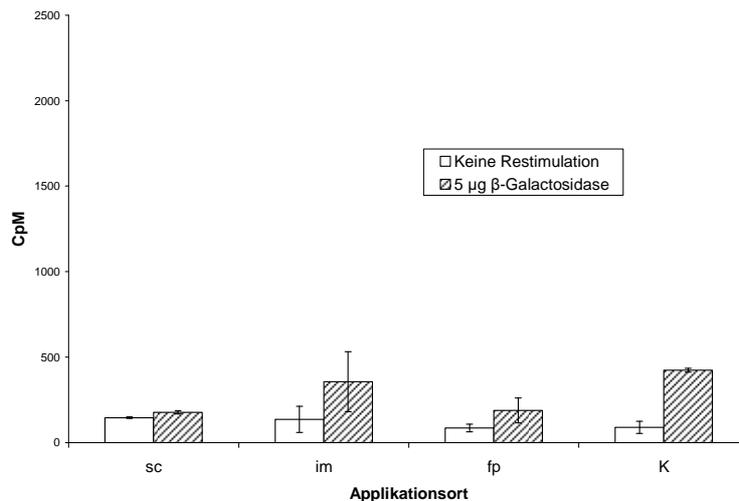
**Abb. 3-5:** Proliferationsassay nach 3 Tagen Kultivierung in FCS-Medium. Die Proliferationsergebnisse der mit PHA/IL-2 stimulierten Proben sind nicht dargestellt, da sie CpM-Werte bis 12000 aufwiesen. Das Experiment wurde mit zwei Mäusen je Gruppe durchgeführt. Proliferation mit 10 µg  $\beta$ -Gal. im Vergleich zur Kontrolle: s.c. = 11,4-fach ( $p=0,001$ ); i.m. = 15,3-fach ( $p=0,005$ ); f.p. = 8,9-fach ( $p=0,14$ ). Proliferation (10 µg  $\beta$ -Gal.) i.m.-Injektion im Vergleich zur s.c.-Injektion: 1,3-fach ( $p=0,06$ ); i.m.-Injektion im Vergleich zur f.p.-Injektion: 1,7-fach ( $p=0,21$ ).

**Abb. 3-6:** Proliferationsassay nach 3 Tagen Kultivierung in X-Vivo-Medium. Die Proliferationsergebnisse der mit PHA/IL-2 stimulierten Proben sind nicht dargestellt, da sie CpM-Werte bis 60000 aufwiesen. Ebenfalls nicht dargestellt sind die Ergebnisse für die mit 50 µg β-Galactosidase stimulierten Proben, da hier ebenfalls hohe CpM-Werte bis 11000 CpM gemessen wurden, jedoch keine deutlichen Unterschiede zur Kontrollgruppe feststellbar waren. Das Experiment wurde mit zwei Mäusen je Gruppe durchgeführt. Proliferation mit 5 µg β-Gal. im Vergleich zur Kontrolle: s.c. = 2,3-fach ( $p=0,19$ ); i.m. = 1,9-fach ( $p=0,02$ ); f.p. = 2,3-fach ( $p=0,39$ ).



**Abb. 3-7:** Proliferationsassay nach 5 Tagen Kultivierung in FCS-Medium. Die Proliferationsergebnisse der mit PHA/IL-2 stimulierten Proben sind ebenfalls nicht dargestellt. Das Experiment wurde mit zwei Mäusen je Gruppe durchgeführt. Proliferation mit 5 µg β-Gal. im Vergleich zur Kontrolle: s.c. = 3,6-fach ( $p=0,07$ ); i.m. = 3,7-fach ( $p=0,06$ ); f.p. = 2,4-fach ( $p=0,19$ ). Proliferation (5 µg β-Gal.) i.m.-Injektion im Vergleich zur s.c.-Injektion: 1,03-fach ( $p=0,70$ ); im Vergleich zur f.p.-Injektion: 1,6-fach ( $p=0,001$ ).



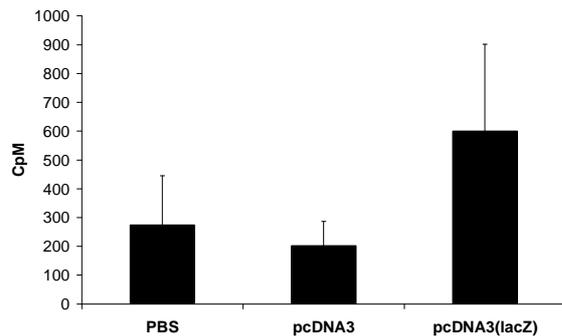


**Abb. 3-8:** Proliferationsassay nach 5 Tagen Kultivierung in X-Vivo-Medium. Die Proliferationsergebnisse der mit PHA/IL-2 stimulierten Proben sind nicht dargestellt. Das Experiment wurde mit zwei Mäusen je Gruppe durchgeführt. Keine Steigerung der proliferativen Immunantwort nach Vakzinierung nachweisbar.

Die Antigen-spezifische proliferative Antwort der Lymphozyten konnte bei Verwendung von FCS-haltigem RPMI-Medium und intramuskulärer Injektion am besten erfasst werden. Die Trennschärfe zwischen den einzelnen Experimenten war bei Verwendung von 5 µg β-Galactosidase am besten, zu hohe Mengen an Protein führten zu einer Zunahme der unspezifischen Proliferation. Bei Kultivierung der Splenozyten in X-Vivo-Medium wurden im Vergleich zur Kultivierung in FCS-Medium keine ausreichenden proliferativen Immunantworten erhalten.

Aufgrund dieser Ergebnisse und den Hinweisen aus der Literatur, dass nach intramuskulären DNA-Vakzinierungen vorzugsweise  $T_H1$ -Immunantworten beobachtet wurden [136], wurde für die weiteren Experimente die intramuskuläre Injektion als Vakzinierungsmethode gewählt und in FCS-haltigem RPMI-Medium mit 5 µg β-Galactosidase restimuliert.

Um einen Einfluss der nicht für Antigen kodierenden Plasmid-DNA auf die Immunantwort zu untersuchen, wurde die proliferative Immunantwort nach Vakzinierung mit β-Galactosidase-kodierendem Plasmid (pcDNA3lacZ) mit der nach Vakzinierung mit einem mock-Vektor (pcDNA3) bzw. PBS verglichen (s. Abb. 3-9). Während nach Vakzinierung mit dem β-Galactosidase-kodierenden Plasmid pcDNA3lacZ eine gesteigerte proliferative Immunantwort beobachtet werden konnte, entsprach die proliferative Immunantwort nach Vakzinierung mit dem mock-Vektor pcDNA3 der nach Vakzinierung mit PBS.



**Abb. 3-9:** Proliferationsassay nach Vakzinierung mit PBS, mock-Vektor (pcDNA3) und  $\beta$ -Galactosidase-kodierendem Plasmid (pcDNA3lacZ). Vakzinierung mit PBS bzw. mock-Vektor haben vergleichbare proliferative Immunantworten zur Folge.

### 3.2.2 Einfluss von Flt-3L auf die proliferative Immunantwort nach DNA-Vakzinierung

C57/BL6-Mäuse wurden entsprechend dem beschriebenen Behandlungsschema vakziniert (s. Abb. 3-4). Die Mäuse wurden in vier Gruppen mit jeweils zwei Mäusen aufgeteilt (s. Tab. 3-1 und Abb. 3-10). Die erste Gruppe erhielt eine zweimalige Vakzinierung mit 100  $\mu$ g  $\beta$ -Galactosidase-Plasmid-DNA, die zweite Gruppe erhielt zusätzlich jeweils fünf Tage vor bis sieben Tage nach jeder Vakzinierung täglich 10  $\mu$ g Flt-3L subkutan appliziert. Um einen Einfluss der Injektionen auf die Versuchsergebnisse auszuschließen, wurde der ersten Gruppe PBS an Stelle von Flt-3L subkutan injiziert. Als Kontrollgruppen dienten Mäuse, die nur mit Flt-3L behandelt wurden ohne DNA-Vakzinierung und Mäuse, die PBS an Stelle von DNA intramuskulär injiziert erhielten.

Vierzehn Tage nach der zweiten Vakzinierung wurden die Milzen der Mäuse entnommen und in Einzelzellsuspensionen überführt. Zur Restimulation wurden 5  $\mu$ g/ml  $\beta$ -Galactosidase-Protein zugesetzt. Nach vier Tagen wurde die proliferative Immunantwort mittels eines [ $^3$ H]-Thymidinassays gemessen.

Behandlung	Anzahl Mäuse	1. s. c. Injektion	1.Vakzinierung	2. s. c. Injektion	2.Vakzinierung	Assay
<b>DNA</b> (1. Gruppe)	2	PBS Tag 1-12	pcDNA3-lacZ Tag 7	PBS Tag 22-33	pcDNA3-lacZ Tag 28	Tag 42
<b>DNA+Flt-3L</b> (2. Gruppe)	2	Flt-3L Tag 1-12	pcDNA3-lacZ Tag 7	Flt-3L Tag 22-33	pcDNA3-lacZ Tag 28	Tag 42
<b>Flt-3L</b> (3. Gruppe)	2	Flt-3L Tag 1-12	PBS Tag 7	Flt-3L Tag 22-33	PBS Tag 28	Tag 42
<b>PBS</b> (4. Gruppe)	2	PBS Tag 1-12	PBS Tag 7	PBS Tag 22-33	PBS Tag 28	Tag 42

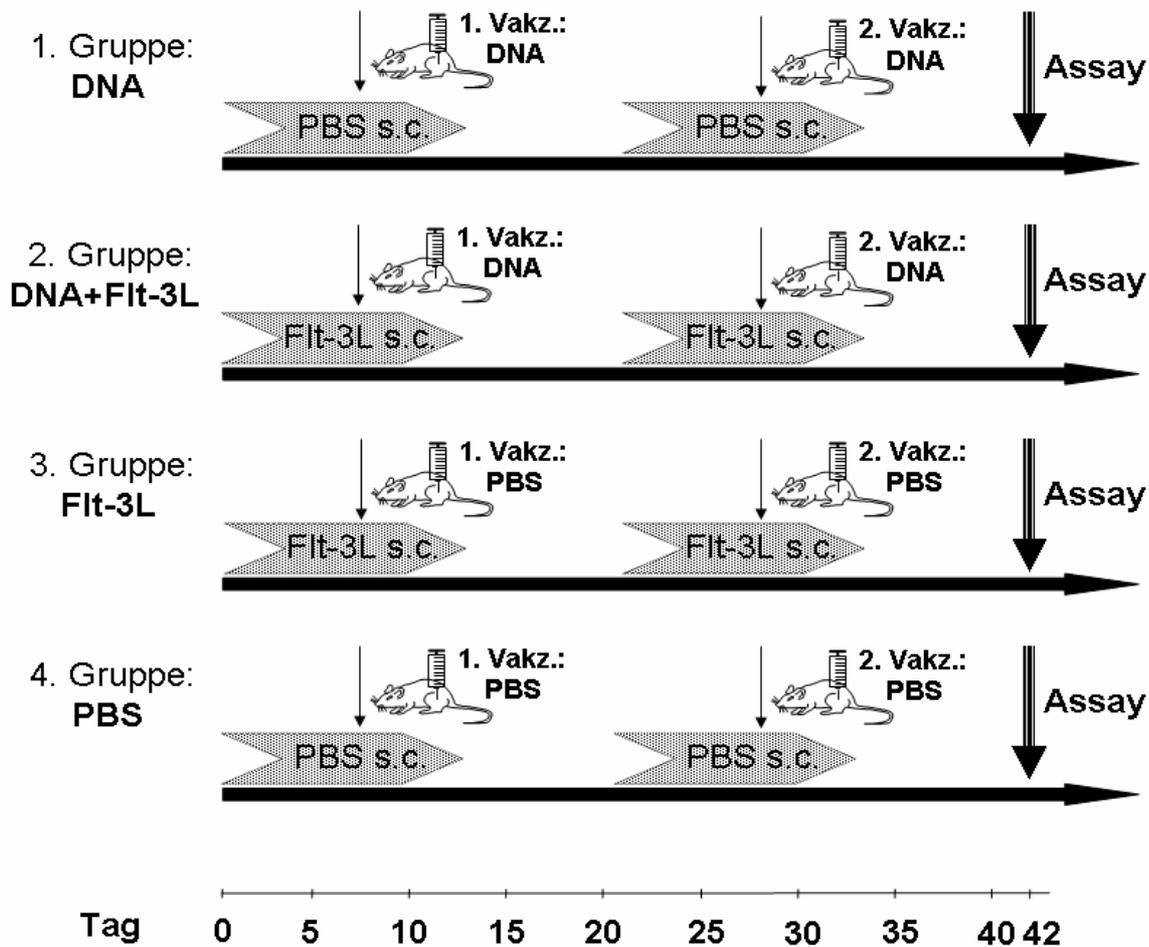
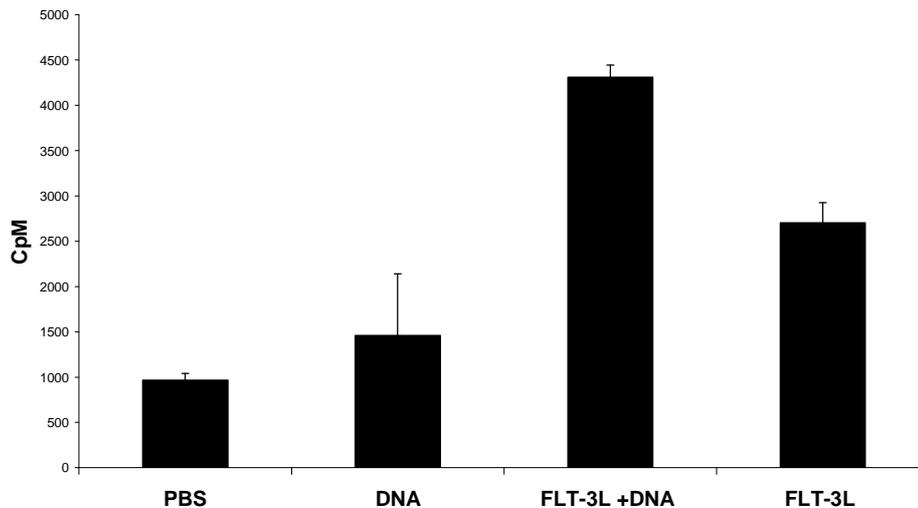


Abb. 3-10: Vakzinierungsschema zur Untersuchung der proliferativen Immunantwort



**Abb. 3-11:** Proliferative Immunantwort gemessen mittels eines [ $^3\text{H}$ ]-Thymidinassays nach Vakzinierung von C57/BL6-Mäusen mit  $\beta$ -Galactosidase-kodierender Plasmid-DNA und Restimulation der Splenozyten in vitro mit  $\beta$ -Galactosidase-Protein. Daten repräsentativ für 3 Experimente, jeweils zwei Mäuse pro Gruppe. Flt-3L steigerte signifikant die proliferative Immunantwort um den Faktor 3,0 gegenüber reiner DNA-Vakzinierung ( $p=0,05$ ). Flt-3L alleine steigerte die proliferative Immunantwort um den Faktor 1,8 ( $p=0,22$ ).

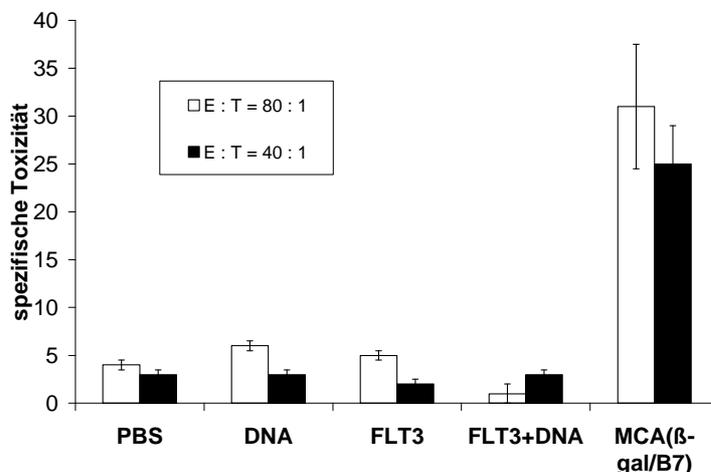
Die Splenozyten der Mäuse, die nur mit Plasmid-DNA vakziniert worden waren, zeigten eine schwache, aber dennoch von der mit PBS vakzinierten Kontrollgruppe abgrenzbare Zunahme der proliferativen Immunantwort. Die Mäuse, die nur mit Flt-3L behandelt worden waren, zeigten eine Zunahme der proliferativen Immunantwort gegenüber den mit PBS bzw. den mit DNA behandelten Gruppen (Faktor 1,8 gegenüber DNA,  $p=0,22$ ). Die Mäuse, die mit lacZ-DNA vakziniert worden waren und zusätzlich mit Flt-3L behandelt wurden, zeigten eine deutliche Antigen-spezifische Immunantwort im Proliferationsassay. Gegenüber den nur mit DNA behandelten Mäusen erhöhte die Behandlung mit Flt-3L die proliferative Immunantwort auf das 3- bis 4-fache ( $p=0,05$ ).

### 3.2.3 Einfluss von Flt-3L auf die zytotoxische Immunantwort

Zytotoxische T-Zellen sind in der Lage, Zielzellen spezifisch aufgrund von Antigenen, die in MHC-Klasse I-Kontext präsentiert werden, zu identifizieren und eine Zytolyse oder Apoptose in diesen Zellen zu induzieren.

Um den Einfluss von Flt-3L auf die Induktion zytotoxischer T-Zellen zu untersuchen, wurden die Splenozyten der entsprechend immunisierten C57/BL6-Mäuse mit  $\beta$ -Galactosidase-exprimierenden Target-Zellen in einen Zytotoxizitätsassay eingesetzt.

Die Splenozyten waren zuvor für fünf Tage mit 5  $\mu$ g/ml  $\beta$ -Galactosidase-Protein restimuliert worden. Die restimulierten T-Zellen wurden in unterschiedlichen Effektor:Target-Verhältnissen von 1:1 bis 100:1 mit Target-Zellen kokultiviert. Als Target-Zellen dienten  $\beta$ -Galactosidase-gepulste, mit  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  markierte MC-57-Zellen. MC-57 ist eine Fibrosarkomzelllinie auf dem genetischen Hintergrund der C57/BL6-Mäuse. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C wurde die spezifische  $^{51}\text{Cr}$ freisetzung aus den Target-Zellen als Triplikate im Überstand des Mediums gemessen. Das Ergebnis ist anhand eines repräsentativen Experiments in Abb. 3-12 dargestellt, insgesamt wurde das Experiment fünfmal durchgeführt. Es konnte in keinem der Experimente eine signifikante Erhöhung der zytotoxischen Immunantwort der restimulierten T-Zellen festgestellt werden. Auch in Experimenten, bei denen entweder mit einem H2-K<sup>b</sup>-restringierten  $\beta$ -Galactosidase-Peptid (DAPIYTNV) oder mit  $\beta$ -Galactosidase transfizierten syngenem Tumorzellen in IL-7 enthaltendem Medium restimuliert wurde, konnte keine signifikante Erhöhung der zytotoxischen Antwort der T-Zellen festgestellt werden.

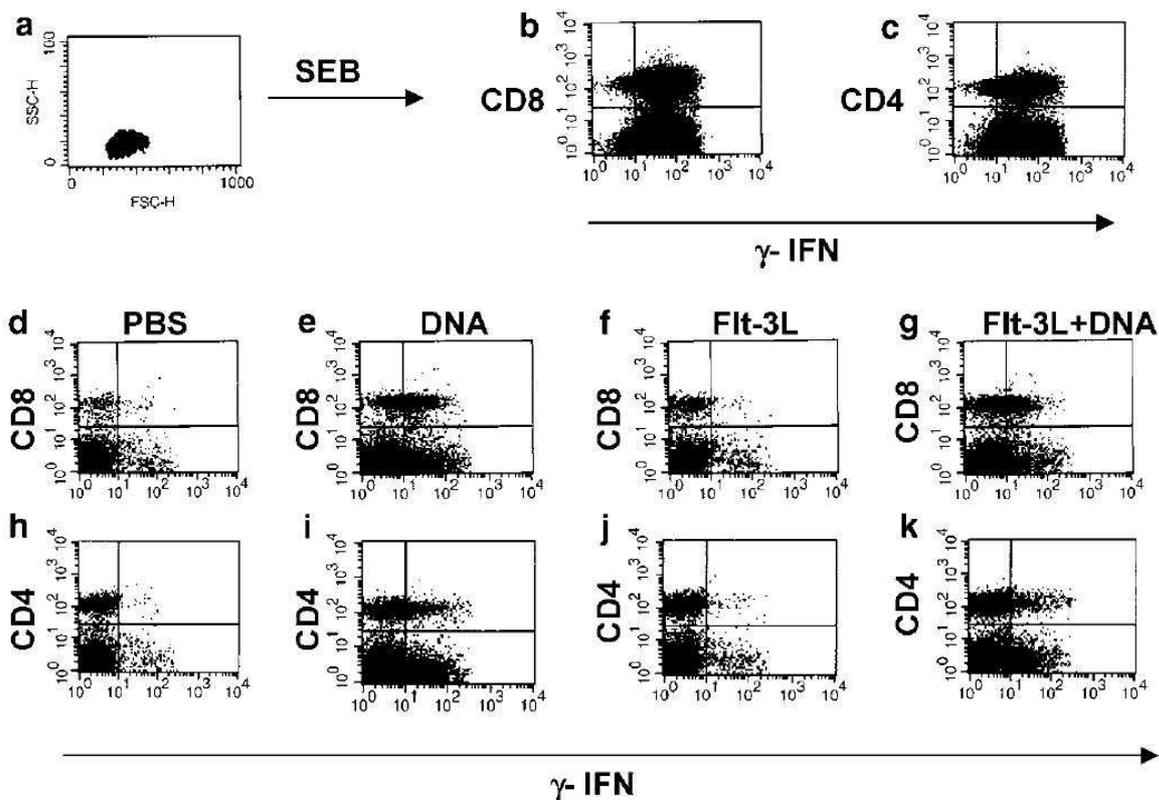


**Abb. 3-12: Zytotoxizitätsassay:** Mit  $\beta$ -Galactosidase-Peptid restimulierte T-Zellen aus unterschiedlichen Versuchstiergruppen (mit PBS, DNA, Flt-3L und Flt-3L+DNA behandelt) wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit  $\beta$ -Galactosidase exprimierenden  $^{51}\text{Cr}$ -markierten MC-57-Zellen inkubiert (Effektor:Target Verhältnis, E:T Ratio). Die freigesetzte Radioaktivität wurde im Überstand gemessen und daraus die spezifische Toxizität berechnet: Spezifische Toxizität in % = (Experimenteller Release – Spontan-release) / (Maximalrelease – Spontanrelease) x 100. Die Daten sind repräsentativ für fünf Experimente. Als Positivkontrolle diente die Immunisierung mit MCA205/B7/ $\beta$ -Gal [1].

### 3.2.4 $\beta$ -Galactosidase-spezifische T-Zellen nach DNA-Vakzinierung

Zum Nachweis von  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen T-Zellen wurden die Splenozyten der vakzinierten Mäuse 24 h mit  $\beta$ -Galactosidase-Antigen restimuliert und auf  $\gamma$ -Interferon-Sekretion untersucht (s. 2.4.6 IFN- $\gamma$ -Sekretionsassay). In Zusammenhang mit einer anti-CD4- bzw. anti-CD8-FITC-Färbung können so aktivierte Antigen-spezifische CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert werden.

Es zeigte sich, dass aktivierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unter den Splenozyten der vakzinierten Mäuse vorhanden waren, sowohl bei alleiniger DNA-Vakzinierung als auch bei zusätzlicher Behandlung mit Flt-3L (Abb. 3-13; CD8<sup>+</sup>:e+g, CD4<sup>+</sup>:i+k). In Kontrollmäusen, die nur mit PBS oder nur mit Flt-3L behandelt wurden, konnten keine Antigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3-13; PBS:d+h, Flt-3L:f+j). Als Positivkontrolle dienten Splenozyten PBS-behandelter Mäuse, die mit Staphylokokken-Enterotoxin-B (SEB) behandelt wurden (Abb. 3-13; a-c).



**Abb. 3-13:** Interferon- $\gamma$ -Sekretionsassay:  $\beta$ -Galactosidase-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Splenozyten vakzinierten Mäuse. Splenozyten unterschiedlich vakzinierten Mäuse wurden für 24h restimuliert mit  $\beta$ -Galactosidase-Antigen und dann auf Interferon- $\gamma$ -Sekretion untersucht.

**a:** Zellpopulation im Light-Scatter; **b/c:** Positivkontrolle (SEB)

**d-g:** Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen; **h-k:** Antigen-spezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

**d,h:** Mäuse, die mit PBS injiziert wurden; **e,i:** Mäuse, die mit  $\beta$ -Galactosidase-DNA injiziert wurden;

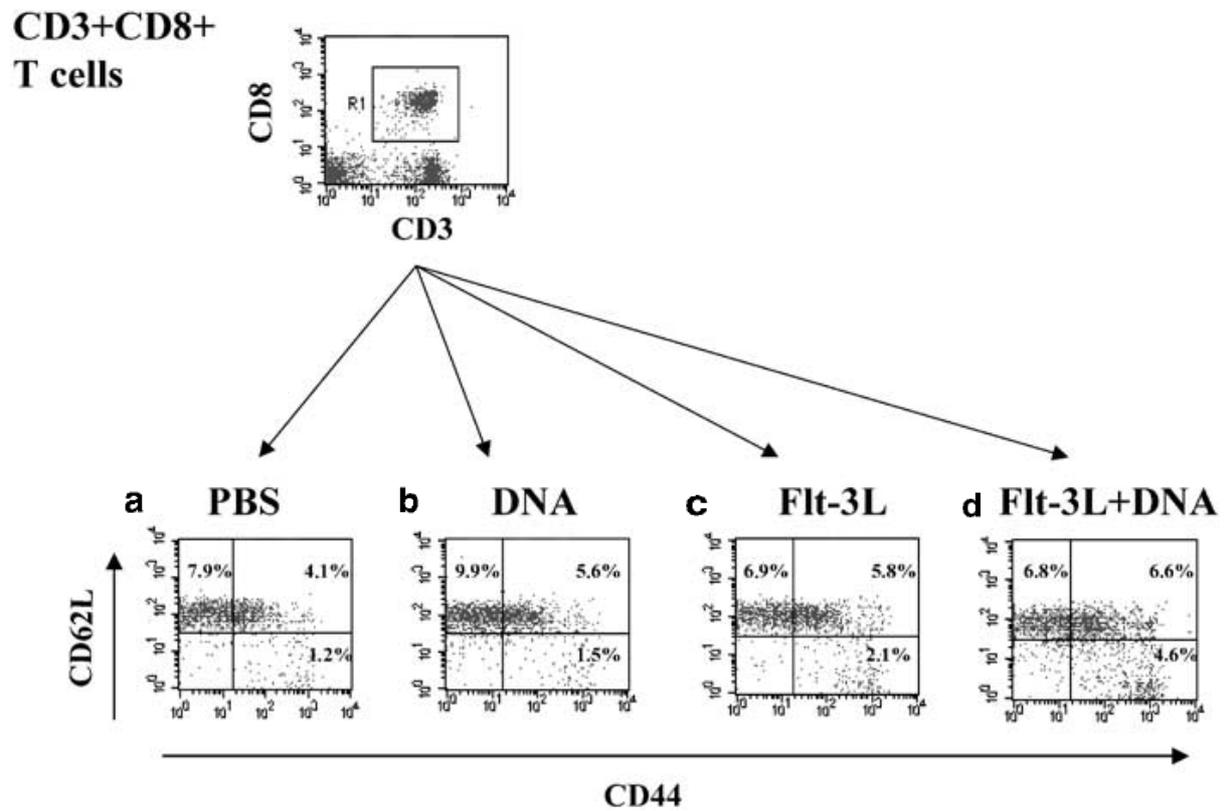
**f,j:** Mäuse, die nur mit Flt-3L injiziert wurden; **g,k:** Mäuse, die mit Flt-3L und  $\beta$ -Galactosidase-DNA injiziert wurden

Der Phänotyp der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde genauer charakterisiert, indem verifiziert wurde, ob es sich bei den aktivierten T-Zellen um zytotoxische T-Zellen handelt. Mit Hilfe der Oberflächenmarker CD62L und CD44 lassen sich zytotoxische T-Zellen von anderen CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen abgrenzen [168]. Die Expression dieser Oberflächenmarker auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen lässt sich mit der zytolytischen Aktivität korrelieren (s. Tab. 3-2). Aktivierte zytotoxische T-Zellen (CTL<sub>E</sub>) haben den Phänotyp CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>.

Phänotyp	T-Zellart	Zytotoxizität (in % spezifische Lyse)
CD44 <sup>lo</sup> CD62L <sup>hi</sup>	Naive T-Zelle	<1
CD44 <sup>hi</sup> CD62L <sup>hi</sup>	Gedächtnis-T-Zelle	<1
CD44 <sup>hi</sup> CD62L <sup>lo</sup>	Zytotoxische T-Zelle (CTL <sub>E</sub> )	41

**Tab. 3-2:** Zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup>-Maussplenozyten nach Oughton [168]

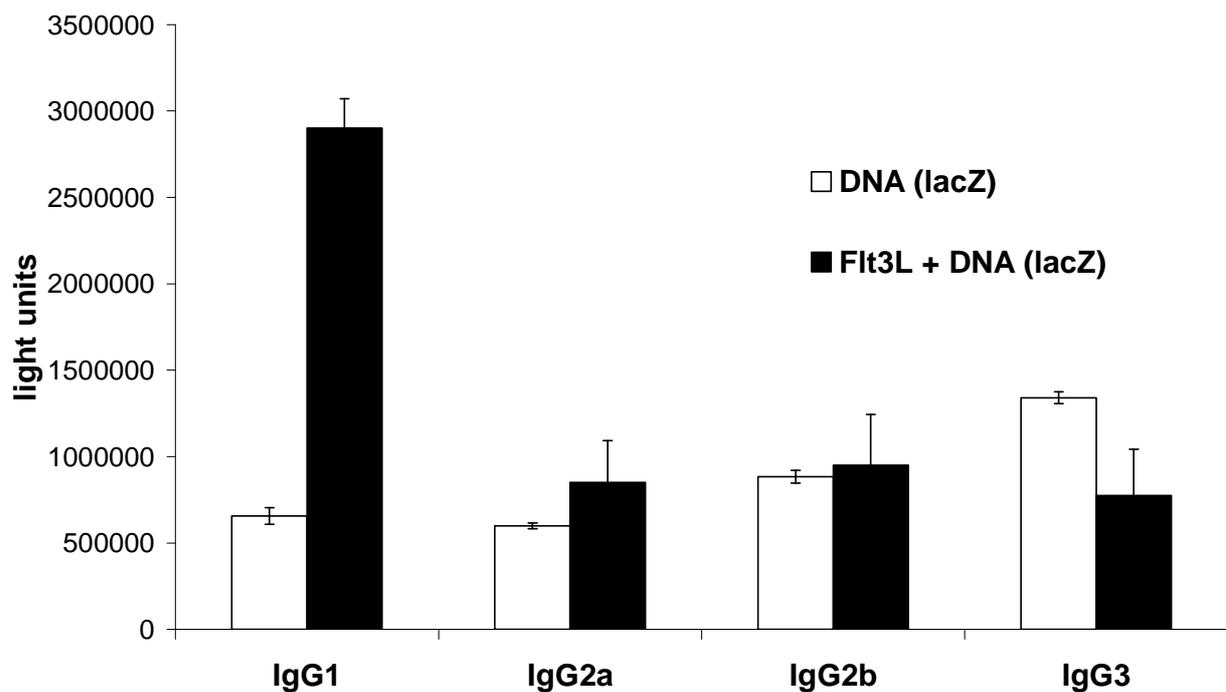
Die überwiegende Mehrheit der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> in vitro restimulierten T-Zellen der mit β-Galactosidase vakzinierten Mäuse zeigte nicht den Phänotyp von aktivierten zytotoxischen T-Zellen, dabei spielte es keine Rolle, ob die Mäuse lediglich mit β-Galactosidase-DNA vakziniert wurden oder zusätzlich mit Flt-3L behandelt wurden (s. Abb. 3-14). Der Anteil an CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup> aktivierten zytotoxischen T-Zellen war in immunisierten Mäusen nicht wesentlich höher gegenüber nicht immunisierten Tieren (1,5 % versus 1,2 %) und der Anteil bei vakzinierten mit Flt-3L behandelten Mäusen gegenüber nur mit Flt-3L behandelten Mäusen war ebenfalls nur geringfügig höher (4,6 % versus 2,1 %).



**Abb. 3-14:** Phänotyp von CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz von  $\beta$ -Galactosidase vakzinierten Mäusen (**b**), von denen ein Teil mit Flt-3L behandelt wurde (**d**). Als Kontrollmäuse dienten Mäuse, die entweder nur mit PBS vakziniert wurden (**a**) oder nur mit Flt-3L behandelt wurden (**c**).

### 3.2.5 Einfluss von Flt-3L auf die humorale Immunantwort

Um den Einfluss von Flt-3L auf die humorale Immunantwort zu untersuchen, wurde den Mäusen an Tag 42 des Vakzinierungsschemas eine Serumprobe entnommen und diese auf IgG-Antikörper gegen  $\beta$ -Galactosidase mittels ELISA untersucht. Es wurden die Serumproben von  $\beta$ -Galactosidase-vakzinieren Mäusen mit Proben von Mäusen verglichen, die zusätzlich zur  $\beta$ -Galactosidase-Vakzinierung mit Flt-3L behandelt worden waren. Es zeigte sich ein Anstieg in der IgG1-Subklasse auf das ca. 4- bis 5-fache bei den mit Flt-3L behandelten Tieren ( $p=0,000026$ ). Es wurde um den Faktor 0,6 weniger IgG3 bei den Flt-3L-behandelten Mäusen nachgewiesen ( $p=0,02$ ). Für die IgG2-Subtypen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

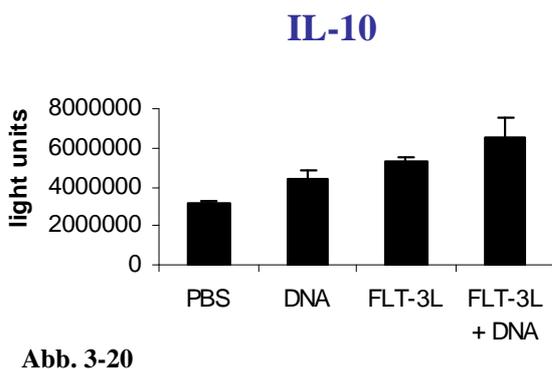
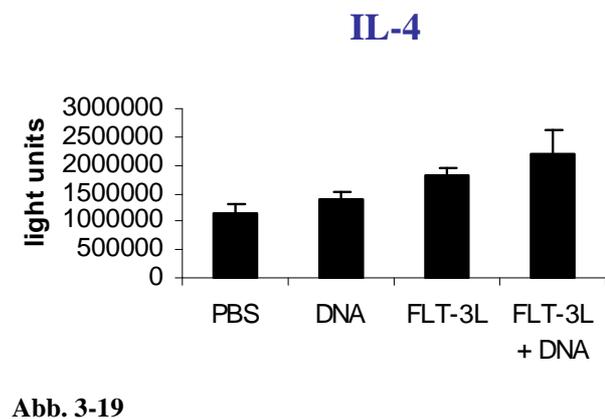
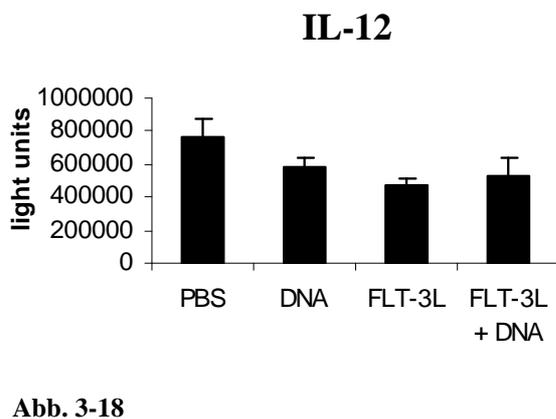
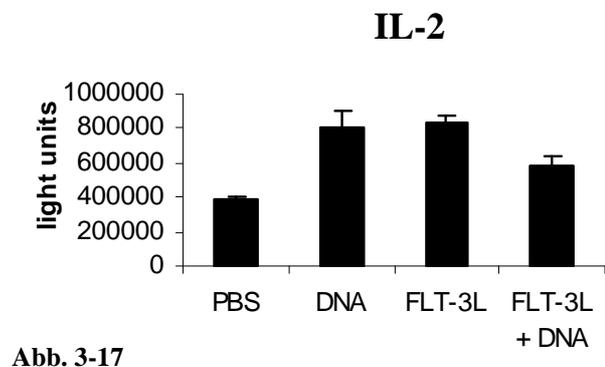
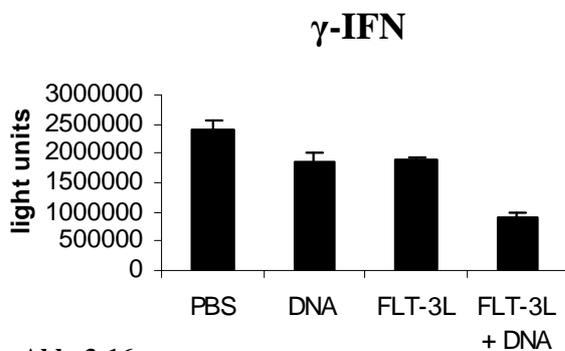


**Abb. 3-15:** Humorale Immunantwort: Vergleich der Subtypen der IgG- $\beta$ -Galactosidase-Antikörper nach Vakzinierung gegen  $\beta$ -Galactosidase mit und ohne gleichzeitige Applikation von Flt-3L (ELISA). Repräsentative Daten für zwei unabhängige Experimente, jeweils zwei Mäuse pro Gruppe. Serum 1:60 verdünnt. Flt-3L steigerte die IgG1-Konzentration im Serum um den Faktor 4,4 ( $p=0,000026$ ). Es konnte um den Faktor 1,4 mehr IgG2a in den Serumproben der Flt-3L-behandelten Mäuse detektiert werden ( $p=0,14$ ). Es fand sich um den Faktor 0,6 weniger IgG3 in den Flt-3L-behandelten Mäusen ( $p=0,02$ ).

### 3.2.6 Einfluss von Flt-3L auf das Zytokinprofil von Splenozyten

Die Polarisierung der Immunantwort durch Flt-3L in Richtung  $T_H1$ - bzw.  $T_H2$ -Antwort wurde anhand der von den Splenozyten produzierten Zytokinprofile untersucht.

Die Splenozyten der entsprechend dem Vakzinierungsschema behandelten Mäuse wurden fünf Tage *in vitro* mit einem H2-K<sup>b</sup>-restringierten  $\beta$ -Galactosidase-Peptid restimuliert und in einem IL-7 enthaltenden Medium kultiviert.  $\gamma$ -IFN, IL-2, IL-12, IL-4 und IL-10 wurden in den Überständen dieser Milzzellkulturen mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-16 – Abb. 3-20 dargestellt.



**Abb. 3-16 bis 3-20:** Zytokinsekretionsprofil von Splenozyten vakzinierter Mäuse nach Restimulation mit  $\beta$ -Galactosidase-Peptid. Die Mäuse wurden mit  $\beta$ -Galactosidase-DNA vakziniert, eine Kontrollgruppe wurde mit PBS injiziert. Jeweils eine Untergruppe erhielt nach Schema Flt-3L appliziert. Flt-3L führte bei den vakzinieren Mäusen zu einer Reduktion der  $\gamma$ -IFN-Produktion um den Faktor 2 ( $p=0,03$ ). Flt-3L erhöhte die IL-4- und IL-10-Sekretion sowohl bei alleiniger Flt-3L-Behandlung als auch in Kombination mit  $\beta$ -Galactosidase-Vakzinierung.  $T_H2$ -Zytokine blau dargestellt.

Bereits die  $\beta$ -Galactosidase-DNA-Vakzinierung alleine zeigte ein Zytokinprofil, das keiner  $T_H1$ -Immunantwort entsprach, sondern eher einen Shift in Richtung  $T_H2$ -Immunantwort repräsentierte. Die Kombination von Flt-3L-Applikation und  $\beta$ -Galactosidase-DNA-Vakzinierung führte zu einer Verstärkung der  $T_H2$ -Polarisierung des Zytokinprofils.

Der  $T_H2$ -Shift zeigte sich in einer Erhöhung der Sekretion von IL-4 und IL-10 und einer Reduktion der  $\gamma$ -IFN-Sekretion durch die Splenozyten. Die alleinige Behandlung mit Flt-3L führte zu einer Reduktion der  $\gamma$ -IFN-Produktion auf das 0,8-fache ( $p=0,09$ ), die Sekretion von IL-4 stieg um den Faktor 1,6 ( $p=0,08$ ), die von IL-10 um den Faktor 1,7 ( $p=0,02$ ). Flt-3L-Behandlung in Kombination mit Immunisierung gegen  $\beta$ -Galactosidase führte zu einer Reduktion der  $\gamma$ -IFN-Produktion um den Faktor 2 ( $p=0,03$ ), erhöhte die IL-4-Sekretion um den Faktor 1,6 ( $p=0,20$ ) und die IL-10-Sekretion um den Faktor 1,5 ( $p=0,19$ ) gegenüber DNA-Vakzinierung alleine. Auch die IL-2-Sekretion der Splenozyten nach Immunisierung gegen  $\beta$ -Galactosidase wurde durch die zusätzliche Behandlung mit Flt-3L in der Tendenz inhibiert und nicht verstärkt. Eine Antigen-spezifische IL-12-Sekretion nach DNA-Vakzinierung war nicht zu verzeichnen, ein Einfluss der zusätzlichen Behandlung mit Flt-3L fand sich nicht.

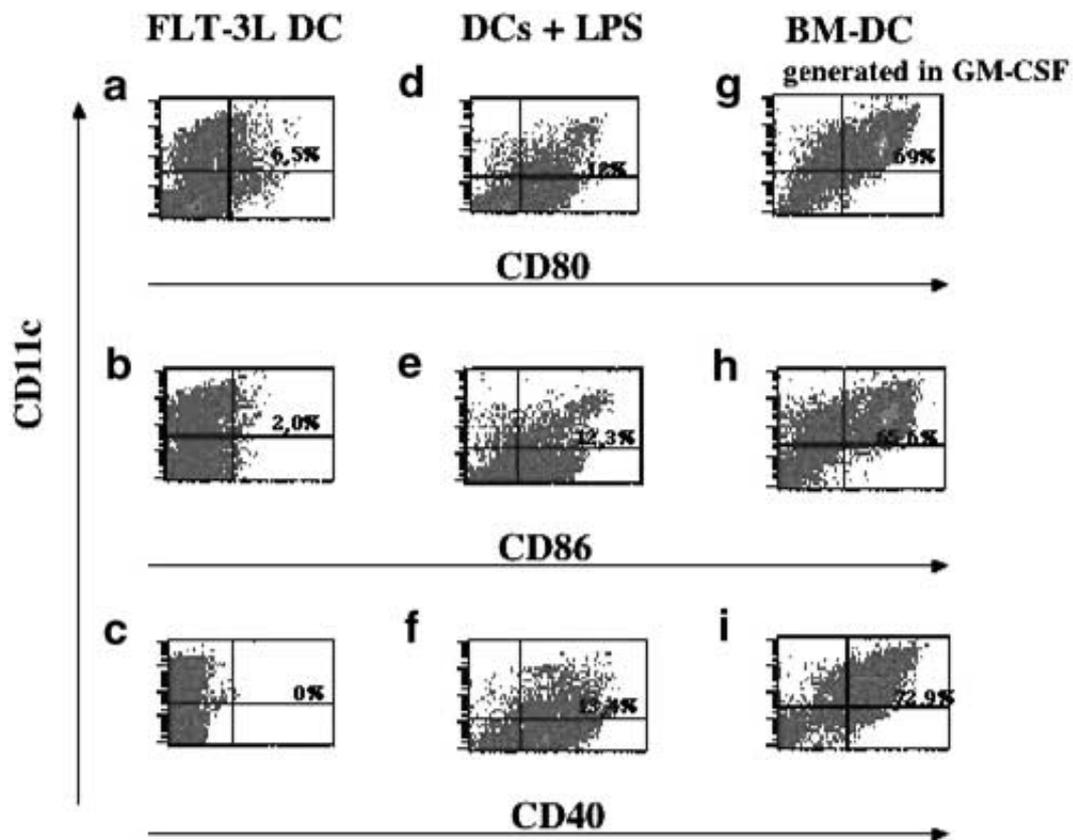
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Applikation von Flt-3L in unserem experimentellen Modell eine  $T_H2$ -Polarisierung der Immunantwort zur Folge hatte.

### 3.3 Reifezustand der Flt-3L-induzierten dendritischen Zellen

Für die Funktion der DCs im Immunsystem ist ihr Ausreifungsgrad und damit vor allem die Expression von bestimmten Oberflächenantigenen, die als Kostimulatoren bei der T-Zellaktivierung mitwirken, von entscheidender Bedeutung. Die expandierten DCs wurden hinsichtlich ihrer Expression dieser Marker mittels FACS-Analyse untersucht. Als Reifungsmarker dienten CD80, CD86 und CD40.

Als Vergleich dienten ausgereifte DCs, die entweder mit LPS (Lipopolysaccharid) aktiviert oder aus dem Knochenmark gewonnen und mit GM-CSF stimuliert wurden.

Die DCs im Knochenmark zeigten einen unreifen, MHC-Klasse II-negativen Phänotyp. Um reife DCs aus Knochenmark zu erhalten, wurde zunächst das aus Femur und Tibia erhaltene Knochenmark von Lymphozyten und MHC-Klasse Ia-positiven Zellen mit Hilfe von Antikörpern befreit. Das Knochenmark wurde dann in Medium kultiviert, das 1000 U/ml GM-CSF enthielt, die nichtadhärenten Leukozyten wurden durch vorsichtiges Waschen in den ersten 2 - 4 Tagen der Kultivierung abgetrennt. An den Tagen 4 - 6 der Kultivierung des Knochenmarks wurden Zellcluster über Sedimentation gewonnen, die dann nach Rekultivierung für 24 h in GM-CSF-enthaltendem Medium eine hohe Anzahl reifer DCs lieferten. Die so gewonnenen DCs zeigten einen reifen Phänotyp mit hoher Expression von MHC-Klasse II-Molekülen [55].



**Abb. 3-21:** FACS-Analyse von DCs, die von Flt-3L-behandelten C57/BL6-Mäusen (a-c) bzw. aus dem Knochenmark (BM) von unbehandelten C57/BL6-Mäusen (g-i) stammten. Die DCs von (d-f) waren zusätzlich 24 h mit LPS behandelt worden, die aus Knochenmark gewonnenen DCs (g-i) waren mit GM-CSF kultiviert worden. Die CD11c<sup>+</sup> dendritischen Zellen wurden hinsichtlich der Reifungsmarker CD80, CD86 und CD40 untersucht.

Die in vivo mit Flt-3L expandierten DCs zeigten einen unreifen Phänotyp, CD40 wurde nicht exprimiert, CD80 und CD86 wurde von weniger als 5 % der Zellen nur schwach exprimiert. Jedoch war die Fähigkeit zur Ausreifung erhalten: Wurden die in vivo expandierten dendritischen Zellen über Nacht mit LPS als Reifungsstimulanz inkubiert, wiesen die DCs einen voll maturierten Phänotyp mit hoher Expression von CD80, CD86 und CD40 auf. Die Expression zeigte eine mit den aus dem Knochenmark gewonnenen und GM-CSF-stimulierten DCs vergleichbare Ausprägung.

## 4 Diskussion

DNA-Vakzinierung ist eine wenig aufwendige und leicht durchzuführende Methode, um in Tiermodellen eine humorale und T-zelluläre Immunantwort zu induzieren [111,169-171], jedoch ist die T-Zellantwort beim Menschen meist zu schwach, um eine effektive Tumorregression zu erreichen [117,132,133,171]. Als Grund für die schwache T-Zellaktivierung wird neben einer Tumor-induzierten Immunsuppression [172-175] eine mangelhafte Aktivierung von T-Zellen durch die Vakzine angesehen [176-178]. Daher wurden verschiedene Strategien entwickelt, um die Effektivität einer DNA-Vakzine zu verbessern, so zum Beispiel die Verwendung von Adjuvantien oder die Optimierung des Applikationsweges (s. Kap. 1.4.2 und 1.4.3).

Flt-3L als DC-expandierender Wachstumsfaktor ist ein möglicher Kandidat, der die Immunantwort entscheidend beeinflussen kann. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit die Hypothese verifiziert bzw. falsifiziert werden, dass Flt-3L über die Expansion von DCs die Vakzinierungseffizienz verbessern und eine zytotoxische Anti-Tumor-Antwort verstärken kann. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die Vakzinierung mit  $\beta$ -Galactosidase-kodierendem DNA-Plasmid als Modellsystem herangezogen. Es handelt sich dabei um ein etabliertes experimentelles System [1,94,158], für das verschiedene immunogene MHC-restringierte Peptide beschrieben worden sind und gezeigt worden ist, dass die Vakzinierung mit  $\beta$ -Galactosidase sowohl humorale als auch zytotoxische Immunantworten auslöst [179,180].

Die Expansion der DCs mit Hilfe von subkutaner Flt-3L-Applikation führte in unseren Experimenten zur Vergrößerung, Gewichts- und Zellzahlzunahme der Milzen, sowohl  $CD11c^+CD11b^+$  myeloische DCs als auch  $CD11c^+CD11b^-$  lymphoide DCs wurden expandiert. Vergleichbare Ergebnisse wurden in einer Studie von Brasel et al. erhalten, bei der Mäusen ähnlich wie in unseren Experimenten über 15 Tage täglich 10  $\mu$ g Flt-3L subkutan appliziert wurde [160]. Flt-3L erhöhte sowohl in der Milz als auch im peripheren Blut und im Knochenmark die Zahl der Leukozyten, in den Mausmilzen konnte eine Vermehrung der B-Zellen, der myeloischen Zellen und der kernhaltigen Erythrozytenvorläufer nachgewiesen werden. Nach acht Tagen Flt-3L-Behandlung wurde eine ca. 100-fache Erhöhung der koloniebildenden Granulozyten- und Makrophageneinheiten (CFU-GM, colony forming units) in den Milzen der Mäuse festgestellt. Auch in Experimenten anderer Arbeitsgruppen wurde die Stimulation von myeloischen Stammzellen und koloniebildenden Zellen im Blut und in der Milz

durch Flt-3L beschrieben [181-183]. Die Wirkungen von Flt-3L zeigten dabei synergistische Effekte zu denen von GM-CSF und G-CSF [184,185]. Flt-3L alleine war sowohl GM-CSF als auch G-CSF überlegen, was die Anzahl mobilisierter CFU betraf. Kombinierte man Flt-3L mit GM-CSF oder G-CSF wurde eine höhere Anzahl CFU mobilisiert als mit Flt-3L alleine.

Die lymphoiden DCs wurden in unseren Experimenten stärker expandiert als die myeloischen DCs (20,3 % lymphoide DCs gegenüber 11,5 % myeloischen DCs). Bei der intramuskulären Injektion eines Flt-3L-kodierenden Plasmids in Experimenten von Peretz et al. wurden ebenfalls überwiegend lymphoide DCs erhalten [186]. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Tatsache, dass die Mehrzahl der lymphoiden Vorläuferzellen der DCs den Flt3-Rezeptor stark exprimieren, die myeloischen Vorläuferzellen aber nur zu einem kleineren Teil [187].

Die Kinetik der Expansion von DCs in der Milz unter Flt-3L-Applikation wurde von Maraskovsky et al. untersucht [162]. Nach sieben Tagen subkutaner Flt-3L-Applikation hatte die Expansion der DCs in den Milzen die Hälfte der maximalen Zellzahl erreicht. Nach Beendigung der Flt-3L-Applikation an Tag 11 nahm die Zahl an DCs rasch ab, an Tag 17 konnten noch 20 % DCs nachgewiesen werden. Parajuli et al. verwendete 2001 nach Voruntersuchungen zur Expansion von DCs unter Flt-3L-Applikation ein ähnliches Behandlungsschema, um den Einfluss von Flt-3L als Adjuvans bei der Vakzinierung mit p53-Plasmid-DNA zu untersuchen [188]. Rekombinantes Flt-3L wurde zehn Tage vor bis einen Tag nach der Vakzinierung täglich i. m. verabreicht, vor der zweiten Impfung nach 14 Tagen wurde ebenfalls 10 Tage lang mit Flt-3L behandelt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für unsere Experimente Tag 7 nach Beginn der Flt-3L-Applikation als Zeitpunkt für die DNA-Vakzinierung gewählt, so dass sichergestellt wurde, dass zum Zeitpunkt der Vakzinierung DCs bereits zu einem großen Teil expandiert waren und durch die Fortführung der Flt-3L-Applikation über 5 Tage während der Initialphase der Immunantwort weiter expandiert wurden.

Sowohl die intramuskuläre als auch die subkutane Vakzinierung riefen in unseren Experimenten ausreichend starke proliferative Immunantworten hervor. Beide Applikationsarten können sowohl humorale als auch zelluläre Immunreaktionen hervorrufen [189], dennoch weisen einige Daten in der Literatur darauf hin, dass subkutane Vakzinierung eine Verschiebung in Richtung auf eine  $T_H2$ -Antwort begünstigt [190], während intramuskuläre Applikation eher zu Zytokinprofilen führt, die eine  $T_H1$ -Antwort begünstigen [191,192]. Die Vakzinierung mit

Plasmid-DNA zeigt bereits ebenfalls eine Bevorzugung der  $T_{H1}$ -Antwort gegenüber anderen Vakzinierungsarten [193].

Die Antigen-spezifische proliferative Immunantwort nach intramuskulärer Vakzinierung mit  $\beta$ -Galactosidase-Plasmid konnte durch Applikation von Flt-3L um den Faktor drei bis vier gesteigert werden. Auch die alleinige Behandlung mit Flt-3L ohne Vakzinierung führte zu einer zweifachen Erhöhung der proliferativen Immunantwort. Die durch die Expansion der DCs bedingte Verschiebung des Verhältnisses von DCs zu T-Zellen könnte eine Ursache für die Aktivierung von T-Zellen und die dadurch hervorgerufene Zunahme der proliferativen Immunantwort bei Flt-3L-Applikation ohne Vakzinierung sein. Auch die durch die Flt-3L-Applikation erhöhte Zytokinproduktion der Splenozyten könnte eine Erklärung für die gesteigerte proliferative Immunantwort bei alleiniger Flt-3L-Applikation liefern [188]. Daß die Flt-3L-Applikation jedoch nicht nur zu einer generellen Steigerung der proliferativen Immunantwort führte, sondern die Antigen-spezifische Immunantwort in unseren Experimenten verstärkte, konnte zum einen dadurch gezeigt werden, dass die proliferative Immunantwort bei Vakzinierung mit  $\beta$ -Galactosidase-kodierendem Plasmid um den Faktor zwei gegenüber der bei alleiniger Flt-3L-Applikation gesteigert wurde. Zum anderen konnte die Antigenspezifität der Immunantwort durch den Nachweis von  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen im Interferon- $\gamma$ -Sekretionsassay belegt werden. Auch andere Gruppen konnten eine Verstärkung der Antigen-spezifischen Antwort infolge Flt-3L-Applikation belegen. Die Immunisierung von Kälbern mit einem Plasmid, das MSP1a (Anaplasma marginale major surface protein 1a) exprimiert, führte zu einer starken  $CD4^+$  T-Zellantwort [194]. Die Behandlung mit einem Flt-3L-kodierenden Plasmid führte zu einer höheren Anzahl an Antigen-spezifischen Effektorzellen, einer erhöhten Antigen-spezifischen Proliferation und vermehrter IFN- $\gamma$ -Sekretion von  $CD4^+$  T-Zellen. Durch die Injektion eines Plasmids, das ein Fusionsprotein aus humanem Flt-3L und HIV-Protein gp120 exprimiert, konnte eine hohe Zahl an gp120 spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen induziert werden [195]. Auch mit Hilfe von Tetramerbindungsstudien konnte in DNA-Vakzinierungsexperimenten mit HIV-1 envelope (env) gezeigt werden, dass Flt-3L die Zahl Antigen-spezifischer  $CD8^+$  T-Zellen erhöht [196]. Die zusätzliche Behandlung mit Flt-3L führte zu einer verstärkten zellulären und humoralen Immunantwort, die Protektion gegenüber einer Virusinfektion wurde durch Flt-3L verbessert.

Obwohl wir die intramuskuläre Vakzinierung mittels Plasmid-DNA gewählt haben, die die Verschiebung der Immunantwort in Richtung auf eine  $T_{H1}$ -Antwort begünstigt [190-193],

konnten in unseren Experimenten keine zytotoxischen T-Zellen (CTL) nachgewiesen werden, dies weder in der durchflußzytometrischen Analyse noch im  $^{51}\text{Cr}$ -Release-Assay mit Antigen-gepulsten Target-Zellen. Eine Erklärung für die fehlende zytotoxische Immunantwort liefert das in den Splenozytenüberständen nachgewiesene Zytokinprofil. Niedrige IFN- $\gamma$ - und IL-12-Konzentrationen und hohe IL-4 und IL-10 weisen auf einen  $T_H2$ -Shift der Immunantwort hin. Auch der Nachweis von hohen Konzentrationen an  $\beta$ -Galactosidase-spezifischem IgG1 bei fehlendem Anstieg von Antigen-spezifischen IgG2a im Serum weist auf eine  $T_H2$ -Polarisierung der Immunantwort hin [197-199].

In der Literatur sind in verschiedenen Arbeiten zytotoxische T-Zellantworten in Verbindung mit adjuvanter Flt-3L-Applikation beschrieben worden. So induzierten Flt-3L-transfizierte DCs, die mit Mut1-Peptid gepulst worden waren,  $T_H1$ -Immunantworten und expandierten tumorspezifische zytotoxische T-Zellen um das zwei- bis dreifache [200]. Mut1 ist ein MHC-Klasse I-restringiertes Peptid, das eine Sequenz von acht Aminosäuren des mutierten Gap-Junction Proteins Connexin 37 umfasst, das aus der Lungenkarzinomzelllinie 3LL isoliert worden war. In diesem Experiment wurden die DCs aus dem Knochenmark gewonnen, mit GM-CSF und IL-4 ausgereift, danach mit Flt-3L-kodierenden adenoviralen Vektoren transduziert, um sie in Tumor-Challenge-Experimenten in vivo einzusetzen. Bei Challenge-Experimenten mit AML-Zellen konnte ein 1,9-facher Anstieg der zytotoxischen T-Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit Flt-3L beobachtet werden [201]. Ebenfalls ein Anstieg Antigen-spezifischer  $CD8^+$  T-Zellen konnte in einem Plasmid-Vakzinierungssystem mit einem Fusionsprotein aus Flt-3L und dem humanen Papillomavirus-16 E7 beobachtet werden [202]. Die Antitumor-Effekte waren dabei unabhängig von  $CD4^+$  T-Zellen. Ebenfalls bei einer DNA-basierten Vakzinierung konnte eine CTL-spezifische Immunität erzeugt werden, wenn Flt-3L in Kombination mit einem Muc-1 Tumorpeptid eingesetzt wurde [203].

Die unterschiedlichen experimentellen Ausgangssysteme liefern einen Erklärungsansatz dafür, dass in diesen Arbeiten anders als in unseren Experimenten zytotoxische Immunantworten nachgewiesen werden konnten. So wurden im Mut-1-Modell Flt-3L-transfizierte DCs verwendet, im AML-Modell wurde ein Challenge mit einer AML-Tumorzelllinie vorgenommen, der selbst die Immunantwort beeinflusst. Tumor-gepulste DCs als Vakzine waren in diesem Modell der Flt-3L-Applikation deutlich überlegen, sowohl im Hinblick auf die Expansion von CTL-Vorläuferzellen als auch auf die Induktion von Gedächtnis-Immunantworten. Im Papillomavirus-Modell wurde ein chimäres Flt-3L-E7-Fusionsgen verwendet. Es konnte gezeigt

werden, dass Zellen, die mit FL-E7-DNA transfiziert worden waren, das E7-Antigen bevorzugt über den MHC-Klasse I-Weg präsentierten. Im Muc-1-Modell wurde Flt-3L als Plasmidvektor appliziert, der zusätzlich für das Tumorpeptid kodierte. Einen entscheidenden Hinweis, dass das Vakzinierungsagens selbst eine große Rolle hinsichtlich der Art der ausgelösten Immunantwort spielt, konnte Parajuli et al. liefern. Mäuse wurden mit Hilfe von p53-kodierenden adenoviralen Vektoren bzw. Plasmiden vakziniert und mit einem Tumor inokuliert, der mutiertes murines p53 exprimierte [188]. In diesem experimentellen Ansatz löste die Vakzine selbst bereits eine  $T_H1$ -Antwort aus, welche durch Flt-3L verstärkt wurde. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass nicht Flt-3L sondern der experimentelle Ansatz und das Microenvironment einen entscheidenden Einfluss auf die Art der Immunantwort haben und dadurch bedingt im Gegensatz zu unseren Experimenten ein Shift in Richtung  $T_H1$ -Immunantwort erfolgt ist.

Im Zusammenhang mit der Applikation von Flt-3L bzw. den Flt-3L-induzierten zytotoxischen Immunantworten wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Anti-Tumor-Immunantworten und Tumorregression beschrieben. Zum Beispiel senkt die Behandlung mit Flt-3L die Tumorstadiumsrate bei Mäusen, die mit einem MCA induzierten Fibrosarkom inokuliert wurden, und führt in einem Teil der Mäuse zur Tumorregression [163]. Dabei spielen jedoch auch nicht-T-Zell-vermittelte Mechanismen eine Rolle [204]. In dem zuvor erwähnten AML-Challenge-Modell zeigten die Mäuse höhere Überlebensraten, jedoch nur, wenn die Behandlung mit Flt-3L bereits vor der Tumorinokulation begann [201]. Langlebige Antigen-spezifische Lymphozyten waren jedoch nicht vorhanden, was sich an der fehlenden Gedächtnis-Immunantwort bemerkbar machte. Durch die intramuskuläre Vakzinierung mit einem Plasmid, das sowohl Flt-3L als auch das Tumorantigen kodierte, konnte eine deutliche Tumorregression in dem zuvor beschriebenen Muc-1-Tumormodell erreicht werden [205]. Die Vakzinierung generierte Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen und die Effektivität der Vakzinierung war entscheidend von der gleichzeitigen Behandlung mit Flt-3L abhängig. Eine effektive Anti-Tumor-Antwort konnte nur bei intramuskulärer Vakzinierung erzielt werden, nicht bei intravenöser Gabe der Vakzine. Nach der intramuskulären Vakzinierung wurde eine Infiltration des Applikationsortes mit  $CD11c^+CD8^-$  DCs beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Rekrutierung der DCs zum Applikationsort der Vakzinierung und die lokale Immunreaktion einen entscheidenden Einfluss auf die Auslösung der Antigen-spezifischen zytotoxischen Immunantwort hatten. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, daß die systemische

Expansion von DCs durch Applikation von Flt-3L wie in unseren Experimenten keine Antigen-spezifische zytotoxische Immunantwort zur Folge hatte.

In einem murinen Mamma-Tumor-Modell verabreichte man Mäusen zur Vakzinierung subkutan Tumorzellen, die entweder Flt-3L oder GM-CSF exprimierten [206]. Nach 4 Wochen wurden den Mäusen Tumorzellen injiziert und das Tumorstadium beobachtet. Die mit den Flt-3L-exprimierenden Tumorzelllinien vakzinierten Mäuse zeigten dabei ein deutlich geringeres Tumorstadium als die Mäuse, die mit den GM-CSF-exprimierenden Zellen vakziniert worden waren. Die Depletion von aktivierten NK-Zellen hob die Immunantwort gegen den Tumor in diesem Modell auf. Hinweise, dass NK-Zellen bei der Flt-3L-vermittelten Anti-Tumor-Immunantwort eine Rolle spielen, finden sich in weiteren Publikationen. So wurde bei der Behandlung von Mäusen mit Flt-3L eine fünffache Erhöhung der NK-Zellen in den Milzen gefunden [207]. Auch in dem weiter oben erwähnten murinen AML-Tumormodell konnte nachgewiesen werden, dass NK-Zellen bei der Anti-Tumor-Antwort die entscheidende Rolle spielten [201]. Nach NK-Zelldepletion war der protektive Effekt der Flt-3L-Applikation auf die Überlebensrate der Mäuse vollständig aufgehoben. Im Mut-1-Tumormodell führte die adenovirale Transfektion von DCs mit einem Flt-3L-kodierenden Vektor zur unspezifischen NK-Zellaktivierung [200]. In einem Lebermetastasenmodell mit C3-Sarkomzellen ließ sich durch Behandlung mit Flt-3L ein deutlicher Antitumoreffekt erreichen, der jedoch nach Depletion der NK-Zellen deutlich reduziert wurde [208].

In anderen Experimenten war die Anti-Tumor-Immunantwort von der zusätzlichen Gabe weiterer Zytokine neben Flt-3L abhängig. So wurde an einem Maus-Kolonkarzinommodell gezeigt, dass die Injektion von Flt-3L-transduzierten xenogenen Zellen zusammen mit Tumorzelllysat und IL-2 eine Anti-Tumor-Immunantwort induzieren und Tumorstadium verhindern konnte, die Anti-Tumor-Antwort war dabei an die gleichzeitige Applikation von IL-2 gebunden [209].

Im Zusammenhang mit der Expansion von DCs mit Hilfe von Flt-3L wurden in der Literatur aber auch inhibitorische Effekte auf die Immunantwort beschrieben. Die durch die Vakzinierung mit HBe/w Ag (Hepatitis B core Antigen) hervorgerufene humorale Immunantwort wurde zum Beispiel durch die gleichzeitige intramuskuläre Injektion eines Plasmids, das Flt-3L kodiert, aufgehoben [210]. Der inhibitorische Effekt von Flt-3L war dosisabhängig und am stärksten ausgeprägt, wenn Flt-3L zur selben Zeit und am selben Ort wie die Vakzinierung verabreicht wurde. Ein weiteres Beispiel für die Induktion von Toleranz durch Flt-3L ist die Beobachtung,

dass Flt-3L das Engraftment von allogenen hämatopoetischen Stammzellen ohne signifikante GVHD fördert [211].

Diese widersprüchlichen Daten in der Literatur, die im Zusammenhang mit Flt-3L-Applikation sowohl immunogene als auch tolerogene Effekte auf die Immunantwort aufzeigen, machen deutlich, dass Flt-3L per se nicht für die Determinierung des  $T_H$ -Shifts der Immunantwort ausschlaggebend ist. Die Ergebnisse unserer Experimente sprechen dagegen, daß Flt-3L-expandierte DCs ohne weiteres Koadjuvans in der Lage sind, eine effiziente zytotoxische Immunantwort zu induzieren. Um eine Erklärung für die fehlende zytotoxische Aktivität der T-Zellen in unseren Experimenten zu finden, wurden die Flt-3L-expandierten DCs genauer charakterisiert. Es zeigte sich, dass die DCs einen unreifen Phänotyp aufwiesen, mit niedrigen Expressionsraten von CD40, CD80 und CD86. Dieser unreife Phänotyp der DCs und die Tatsache, dass die Antigenpräsentation durch unreife DCs eher tolerogene als immunogene Effekte auf die Immunantwort hat [212], liefern eine Erklärung für den fehlenden  $T_H1$ -Shift der Immunantwort in unseren Experimenten trotz adjuvanter Flt-3L-Applikation. Der geringe Effekt von Flt-3L auf die Expansion ausgereifter DCs wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt [213]. Brasel et al. zeigte, dass durch die Kultivierung von murinen Knochenmarkszellen in hoher Zelldichte ( $10^6$  Zellen/ml) mit Flt-3L zu ca. 50 % reife  $CD86^+MHCII^+$  DCs erhalten wurden [214]. Da die Expansion von DCs eine Abhängigkeit von der Zelldichte zeigte [215], vermutet man, dass autokrine Mechanismen eine Rolle spielten, die auch die Ausreifung der DCs beeinflussen könnten. Auch in diesem experimentellen System konnte die volle Ausreifung der DCs nur erreicht werden, wenn die DCs die letzten 24 h mit LPS oder IFN- $\alpha$  inkubiert wurden.

Neben dem Ausreifungszustand der DCs tragen verschiedene andere Faktoren zur weiteren Determination der Immunantwort bei. Das Protein bzw. Peptid mit dem vakziniert wird, entscheidet wesentlich mit, ob eine  $T_H1$ - oder eine  $T_H2$ -Immunantwort hervorgerufen wird. Dabei sind Dosierung und Art der Antigenpräsentation über MHC-Klasse I oder II entscheidend [216-219]. Der Promotor, der zur Expression des Proteins benutzt wird, beeinflusst ebenfalls die Polarisierung der Immunantwort. Der Anteil an CpG-Sequenzen in der DNA-Vakzine beeinflusst über Toll-like-Rezeptoren (TLR) die Ausrichtung der Immunantwort [218]. Unter Ausnutzung dieser Tatsache kann durch gleichzeitige Applikation von Flt-3L und CpG-reicher DNA Anti-Tumor-Immunität induziert werden [220]. Die CpG-reichen DNA-Sequenzen führen zu einer Ausreifung der DCs, was gesteigerte proliferative T-Zellantworten und eine Aktivierung

von NK-Zellen zur Folge hat [221]. Daß das Microenvironment eine entscheidende Rolle bei Anti-Tumor-Immunantworten spielt, zeigte sich auch in einem Maus-Prostata-Tumormodell. Es wurden durch Flt-3L zwar erfolgreich DCs in das Tumorgewebe rekrutiert, jedoch verloren die DCs im Verlauf ihre MHC-Klasse II-Expression, was nicht durch Reifungssignale wie CD40L oder durch Flt-3L verhindert werden konnte [222]. Das Microenvironment des Tumors führte in diesem Modell zu einem Funktionsverlust der tumorinfiltrierenden T-Zellen, so dass nur eine transiente Tumorregression beobachtet werden konnte. Auch Applikationsart und -ort der Vakzine und die Verwendung weiterer Zytokine beeinflussen die Polarisierung der Immunantwort [223,224].

Unsere Hypothese, dass die Expansion von DCs mit Flt-3L zu unreifen DCs führt, die ohne weitere Reifungssignale eher eine  $T_H2$ - als  $T_H1$ -Polarisierung der Immunantwort verursachen, wird durch weitere Daten in der Literatur gestützt. So wurde in einer klinischen Studie, bei der Flt-3L als Adjuvans bei einer zugelassenen Hepatitis B-Impfung eingesetzt wurde, die Beobachtung gemacht, dass die Behandlung mit Flt-3L die DCs zwar expandiert, jedoch keine Erhöhung der Hepatitis B-Antikörpertiter verursachte [225]. In einer Studie mit Patienten, die an einem HER-2/neu-exprimierendem Prostatatumor litten und Flt-3L als Adjuvans bei der Peptidvakzinierung mit HER-2/neu erhielten, konnten keine Antigen-spezifischen T-Zellantworten im ELISPOT trotz Expansion von DCs detektiert werden [226]. In einem Mausmodell zur oralen Immunogenität von Ovalbumin führte die Behandlung mit Flt-3L zur Auslösung von Toleranz [227], wurde Ovalbumin allerdings systemisch verabreicht, verstärkte die Behandlung mit Flt-3L die Immunantwort durch B- und T-Zellen, basierend auf einem CD40-CD40L abhängigen Mechanismus [228]. Die Beobachtung, dass in diesem Modell  $CD86^+$  reife dendritische Zellen gefunden wurden, sowie die Abhängigkeit von der CD40-CD40L Wechselwirkung lassen darauf schließen, dass hier zusätzliche Reifungssignale eine Rolle gespielt haben, die in unserem experimentellen System nicht vorhanden waren. In einer Studie von Diener et al. wurde die adjuvante Rolle von Flt-3L-Applikation bei der Immunisierung von Mäusen mit Ovalbumin untersucht [229]. Mäuse wurden mit Ovalbumin bzw. mit Ovalbumin emulgiert in Freund's Adjuvans (CFA) immunisiert, mit oder ohne die vorherige Expansion von DCs mittels Flt-3L. Die Flt-3L-expandierten DCs konnten nur als im Kontext von CFA ausgereifte DCs die Antigen-spezifischen T-Zellen so aktivieren, dass eine zytolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die Autoren der Studie kommen daher zu dem Schluß, dass

Flt-3L eine Immunantwort als Koadjuvans verstärken kann, jedoch Flt-3L alleine nicht in der Lage ist, die Art der Immunantwort zu verändern.

Zusammenfassend ist Flt-3L ein effektives Adjuvans zur Verstärkung einer Immunantwort, die in Zusammenhang mit einer Flt-3L-Applikation beobachteten Immunantworten können jedoch sehr unterschiedliche Polarisierungen aufweisen. Unter Einbeziehung der aktuellen Literaturdaten lässt sich aus unseren experimentellen Ergebnissen die Hypothese aufstellen, dass Flt-3L per se keinen Einfluss darauf hat, ob Immunität oder Toleranz bei einer Vakzinierung induziert wird oder ob eine Polarisierung in Richtung  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Antwort stattfindet. In unserem Fall scheint Flt-3L eine vorhandene  $T_H2$ -Polarisierung der Immunantwort durch  $\beta$ -Galactosidase-DNA zu verstärken. Dies steht im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Beobachtung, dass Vakzinierung mit lacZ-DNA ohne Adjuvans vorwiegend zu einer starken humoralen und proliferativen Immunantwort führt, jedoch keine zytotoxische Immunantwort auslöst [180]. Die Verstärkung der  $T_H2$ -Polarisierung durch Flt-3L zeigte sich auch in der gesteigerten IgG1-Antikörperproduktion bei Flt-3L-Applikation.

In der Literatur finden sich viele Hinweise darauf, dass das Zytokinmilieu, das DC:T-Zellverhältnis, die Dosierung des Antigens und zusätzliche Stimulantien entscheidend sind für die Polarisierung der Immunantwort. Der Subtyp der die Immunantwort initiiierenden DCs spielt dagegen eine vergleichsweise geringe Rolle bei der Determinierung der Immunantwort [219,230]. Dies wird durch Untersuchungen an HIV-DNA-Vakzinen bekräftigt, die zeigten, dass die Art der induzierten Immunantworten vom Charakter des Antigens abhängen, während das als Adjuvans verwendete Zytokin lediglich das Ausmaß der Immunantwort bestimmte [231].

Im Hinblick auf die Fragestellung der Arbeit kann also gesagt werden, dass es nicht hinreichend ist, die in Verbindung mit der Flt-3L-Applikation erfolgte Immunverstärkung zur Tumorthherapie zu nutzen, vielmehr bedarf es einer weiteren Optimierung des Versuchsansatzes, um einen Shift der Immunantwort in Richtung einer  $T_H1$ -Immunantwort zu erreichen.

Das erste Augenmerk sollte dabei auf der Ausreifung der expandierten DCs liegen. Mit Flt-3L expandierte DCs sind nur dann fähig, T-Zellen zu stimulieren, wenn sie zusätzlichen Reifungssignalen ausgesetzt sind [232]. Wie in unseren Experimenten gezeigt, können die expandierten unreifen DCs durch LPS oder Interferon- $\alpha$  in vitro innerhalb von 24 h in reife DCs überführt werden [214]. Die Verwendung CpG-reicher DNA-Sequenzen zur Aktivierung der DCs bei der Vakzinierung könnte in unserem experimentellen System ebenfalls zu einem  $T_H1$ -Shift der Immunantwort beitragen, wie an Anti-Tumor-Antworten gegen Tumorzelllinien,

die mit Ovalbumin (OVA) transfiziert worden waren, gezeigt werden konnte [220]. Eine weitere Möglichkeit, die Immunantwort in unserem System zu beeinflussen, wäre der Einsatz eines DC-spezifischen Promotors (pDec2), da die ubiquitäre Expression der  $\beta$ -Galactosidase, wie in unserem Fall durch den CMV-Promotor geschehen, ebenfalls zur  $T_H2$ -Polarisierung der Immunantwort führen oder Toleranz induzieren kann.

Unsere sowie die Daten in der Literatur sprechen dafür, dass Flt-3L in der Tumorstimmulierung zukünftig nur dann eine Rolle spielen kann, wenn der jeweilige immuntherapeutische Ansatz auch zu einer Ausreifung der Flt-3L-induzierten DCs führt. Die Kombination der Amplifikation der Immunantwort durch Flt-3L mit einer  $T_H1$ -Polarisierung der Immunantwort wäre die Grundlage für eine effektive Anti-Tumor-Antwort.

## 5 Referenzen

1. Cayeux, S., Richter, G., Noffz, G., Dorken, B. & Blankenstein, T. Influence of gene-modified (IL-7, IL-4, and B7) tumor cell vaccines on tumor antigen presentation. *J. Immunol.* **158**, 2834-2841 (1997).
2. Wu, L. & Dakic, A. Development of dendritic cell system. *Cell Mol. Immunol.* **1**, 112-118 (2004).
3. Shortman, K. & Liu, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151-161 (2002).
4. Waller, E. K. & Ernstoff, M. S. Modulation of antitumor immune responses by hematopoietic cytokines. *Cancer* **97**, 1797-1809 (2003).
5. Coley, W. B. A Preliminary Note on the Treatment of Inoperable Sarcoma by the Toxic Product of Erysipelas. *Post-graduate* 8:278-86, (1893) .
6. Garcia, K. C. & Adams, E. J. How the T cell receptor sees antigen--a structural view. *Cell* **122**, 333-336 (2005).
7. Germain, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**, 287-299 (1994).
8. Rock, K. L. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol. Today* **17**, 131-137 (1996).
9. Pennisi, E. Teetering on the brink of danger. *Science* **271**, 1665-1667 (1996).
10. Larkin, M. Polly Matzinger: immunology's dangerous thinker. *Lancet* **350**, 38 (1997).
11. Austyn, J. M. Death, destruction, danger and dendritic cells. *Nat. Med.* **5**, 1232-1233 (1999).
12. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991-1045 (1994).
13. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**, 1-14 (2005).
14. Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Foti, M. & Ricciardi-Castagnoli, P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol. Today* **20**, 200-203 (1999).
15. Cerdan, C. *et al.* CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high-affinity IL2 receptor. *Res. Immunol.* **146**, 164-168 (1995).

16. Jain, J., Loh, C. & Rao, A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 333-342 (1995).
17. Nakamura, T., Kamogawa, Y., Bottomly, K. & Flavell, R. A. Polarization of IL-4- and IFN-gamma-producing CD4+ T cells following activation of naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* **158**, 1085-1094 (1997).
18. Croft, M., Carter, L., Swain, S. L. & Dutton, R. W. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J. Exp. Med.* **180**, 1715-1728 (1994).
19. Nishimura, T. *et al.* The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **46 Suppl**, S52-S61 (2000).
20. Hamilton, D. H. & Bretscher, P. A. Different immune correlates associated with tumor progression and regression: implications for prevention and treatment of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 1125-1136 (2008).
21. Winter, H. *et al.* Tumour-induced polarization of tumour vaccine-draining lymph node T cells to a type 1 cytokine profile predicts inherent strong immunogenicity of the tumour and correlates with therapeutic efficacy in adoptive transfer studies. *Immunology* **108**, 409-419 (2003).
22. To, W. C., Seeley, B. M., Barthel, S. W. & Shu, S. Therapeutic efficacy of Th1 and Th2 L-selectin--CD4+ tumor-reactive T cells. *Laryngoscope* **110**, 1648-1654 (2000).
23. Willimsky, G. & Blankenstein, T. The adaptive immune response to sporadic cancer. *Immunol. Rev.* **220**, 102-112 (2007).
24. They, C. & Amigorena, S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 45-51 (2001).
25. Underhill, D. M., Bassetti, M., Rudensky, A. & Aderem, A. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J. Exp. Med.* **190**, 1909-1914 (1999).
26. Guermonprez, P., England, P., Bedouelle, H. & Leclerc, C. The rate of dissociation between antibody and antigen determines the efficiency of antibody-mediated antigen presentation to T cells. *J. Immunol.* **161**, 4542-4548 (1998).
27. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
28. Young, J. W. & Steinman, R. M. Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J. Exp. Med.* **171**, 1315-1332 (1990).
29. Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 271-296 (1991).

30. Engering, A. J. *et al.* The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2417-2425 (1997).
31. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389-400 (1995).
32. Reis e Sousa, Stahl, P. D. & Austyn, J. M. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* **178**, 509-519 (1993).
33. Chapman, H. A. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 93-102 (1998).
34. Song, R. & Harding, C. V. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J. Immunol.* **156**, 4182-4190 (1996).
35. Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G. & Watts, C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 280-288 (1997).
36. Klinman, D. M., Yamshchikov, G. & Ishigatsubo, Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* **158**, 3635-3639 (1997).
37. Mazoni, A. & Segal, D. M. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 721-730 (2004).
38. Kadowaki, N. *et al.* Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* **194**, 863-869 (2001).
39. Edwards, A. D. *et al.* Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* **33**, 827-833 (2003).
40. Singh, M. & Srivastava, I. Advances in vaccine adjuvants for infectious diseases. *Curr. HIV. Res.* **1**, 309-320 (2003).
41. Kersten, G. & Hirschberg, H. Antigen delivery systems. *Expert. Rev. Vaccines.* **3**, 453-462 (2004).
42. Scheerlinck, J. P. & Greenwood, D. L. Particulate delivery systems for animal vaccines. *Methods* **40**, 118-124 (2006).
43. Shortman, K. & Naik, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 19-30 (2007).

44. Traver, D. *et al.* Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* **290**, 2152-2154 (2000).
45. Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L. & Akashi, K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* **97**, 3333-3341 (2001).
46. Wu, L. *et al.* Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* **98**, 3376-3382 (2001).
47. Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L. & Shortman, K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol.* **164**, 2978-2986 (2000).
48. Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V. & Gilliet, M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol.* **2**, 585-589 (2001).
49. Liu, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262 (2001).
50. Hochrein, H. *et al.* Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J. Immunol.* **166**, 5448-5455 (2001).
51. Pulendran, B. *et al.* Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 1036-1041 (1999).
52. Dudziak, D. *et al.* Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* **315**, 107-111 (2007).
53. Henri, S. *et al.* The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J. Immunol.* **167**, 741-748 (2001).
54. Scheicher, C., Mehlig, M., Zecher, R. & Reske, K. Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol. Methods* **154**, 253-264 (1992).
55. Inaba, K. *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **176**, 1693-1702 (1992).
56. Steinman, R. M., Pack, M. & Inaba, K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol. Rev.* **156**, 25-37 (1997).
57. Pulendran, B. *et al.* Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J. Immunol.* **159**, 2222-2231 (1997).
58. De, S. T. *et al.* Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J. Exp. Med.* **184**, 1413-1424 (1996).

59. Leenen, P. J. *et al.* Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J. Immunol.* **160**, 2166-2173 (1998).
60. Kronin, V. *et al.* A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J. Immunol.* **157**, 3819-3827 (1996).
61. Suss, G. & Shortman, K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **183**, 1789-1796 (1996).
62. Maldonado-Lopez, R. *et al.* CD8alpha<sup>+</sup> and CD8alpha<sup>-</sup> subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* **189**, 587-592 (1999).
63. Salomon, B., Cohen, J. L., Masurier, C. & Klatzmann, D. Three populations of mouse lymph node dendritic cells with different origins and dynamics. *J. Immunol.* **160**, 708-717 (1998).
64. Hart, D. N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**, 3245-3287 (1997).
65. MacDonald, K. P. *et al.* Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* **100**, 4512-4520 (2002).
66. Galy, A., Travis, M., Cen, D. & Chen, B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* **3**, 459-473 (1995).
67. Res, P. *et al.* CD34<sup>+</sup>CD38<sup>dim</sup> cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* **87**, 5196-5206 (1996).
68. Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R. M. & Bhardwaj, N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Methods* **196**, 121-135 (1996).
69. Romani, N. *et al.* Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* **196**, 137-151 (1996).
70. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**, 1109-1118 (1994).
71. Grouard, G. *et al.* The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* **185**, 1101-1111 (1997).
72. Rissoan, M. C. *et al.* Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**, 1183-1186 (1999).

73. O'keeffe, M. *et al.* Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood* **101**, 1453-1459 (2003).
74. Bjorck, P. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* **98**, 3520-3526 (2001).
75. Nakano, H., Yanagita, M. & Gunn, M. D. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1171-1178 (2001).
76. O'keeffe, M. *et al.* Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.* **196**, 1307-1319 (2002).
77. sselin-Paturel, C. *et al.* Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* **2**, 1144-1150 (2001).
78. Hochrein, H., O'Keeffe, M. & Wagner, H. Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Hum. Immunol.* **63**, 1103-1110 (2002).
79. Grohmann, U. *et al.* IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 alpha+ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Immunol.* **167**, 708-714 (2001).
80. Hawiger, D. *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* **194**, 769-779 (2001).
81. Moser, M. & Murphy, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.* **1**, 199-205 (2000).
82. Peters, J. H., Gieseler, R., Thiele, B. & Steinbach, F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol. Today* **17**, 273-278 (1996).
83. Chen, H. W. *et al.* Inducing long-term survival with lasting anti-tumor immunity in treating B cell lymphoma by a combined dendritic cell-based and hydrodynamic plasmid-encoding IL-12 gene therapy. *Int. Immunol.* **15**, 427-435 (2003).
84. Akiyama, Y. *et al.* Enhancement of antitumor immunity against B16 melanoma tumor using genetically modified dendritic cells to produce cytokines. *Gene Ther.* **7**, 2113-2121 (2000).
85. Wan, Y., Bramson, J., Carter, R., Graham, F. & Gauldie, J. Dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding a model tumor-associated antigen for tumor vaccination. *Hum. Gene Ther.* **8**, 1355-1363 (1997).
86. Esslinger, C., Romero, P. & MacDonald, H. R. Efficient transduction of dendritic cells and induction of a T-cell response by third-generation lentivectors. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1091-1100 (2002).

87. Mailliard, R. B. & Lotze, M. T. Dendritic cells prolong tumor-specific T-cell survival and effector function after interaction with tumor targets. *Clin. Cancer Res.* **7**, 980s-988s (2001).
88. Gabrilovich, D. I., Nadaf, S., Corak, J., Berzofsky, J. A. & Carbone, D. P. Dendritic cells in antitumor immune responses. II. Dendritic cells grown from bone marrow precursors, but not mature DC from tumor-bearing mice, are effective antigen carriers in the therapy of established tumors. *Cell Immunol.* **170**, 111-119 (1996).
89. Mayordomo, J. I. *et al.* Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat. Med.* **1**, 1297-1302 (1995).
90. Porgador, A. & Gilboa, E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **182**, 255-260 (1995).
91. Nair, S. K., Snyder, D., Rouse, B. T. & Gilboa, E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int. J. Cancer* **70**, 706-715 (1997).
92. Zitvogel, L. *et al.* Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J. Exp. Med.* **183**, 87-97 (1996).
93. Ashley, D. M. *et al.* Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J. Exp. Med.* **186**, 1177-1182 (1997).
94. Paglia, P., Chiodoni, C., Rodolfo, M. & Colombo, M. P. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J. Exp. Med.* **183**, 317-322 (1996).
95. Gabrilovich, D. I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* **2**, 1096-1103 (1996).
96. Serody, J. S., Collins, E. J., Tisch, R. M., Kuhns, J. J. & Frelinger, J. A. T cell activity after dendritic cell vaccination is dependent on both the type of antigen and the mode of delivery. *J. Immunol.* **164**, 4961-4967 (2000).
97. Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovskiy, J., Munz, C. & Bhardwaj, N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* **193**, 233-238 (2001).
98. Dhodapkar, M. V. & Steinman, R. M. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* **100**, 174-177 (2002).

99. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1213-1222 (2000).
100. Steinman, R. M. & Dhodapkar, M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int. J. Cancer* **94**, 459-473 (2001).
101. Nestle, F. O. Dendritic cell vaccination for cancer therapy. *Oncogene* **19**, 6673-6679 (2000).
102. Ito, Y. A tumor-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (Shope) of cottontail rabbits. *Virology* **12**, 596-601 (1960).
103. Fried, M. *et al.* Infectivity in mouse fibroblasts of polyoma DNA integrated into plasmid pBR322 or lambdoid phage DNA. *Nature* **279**, 811-816 (1979).
104. Will, H. *et al.* Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature* **299**, 740-742 (1982).
105. Dubensky, T. W., Campbell, B. A. & Villarreal, L. P. Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**, 7529-7533 (1984).
106. Wolff, J. A. *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**, 1465-1468 (1990).
107. Tang, D. C., DeVit, M. & Johnston, S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**, 152-154 (1992).
108. Ulmer, J. B. *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**, 1745-1749 (1993).
109. Weiner, D. B. & Kennedy, R. C. Genetic vaccines. *Sci. Am.* **281**, 50-57 (1999).
110. Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W. & Liu, M. A. DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 617-648 (1997).
111. Gurunathan, S., Klinman, D. M. & Seder, R. A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization\*. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 927-974 (2000).
112. Wolff, J. A., Ludtke, J. J., Acsadi, G., Williams, P. & Jani, A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 363-369 (1992).
113. Feltquate, D. M. DNA vaccines: vector design, delivery, and antigen presentation. *J. Cell Biochem. Suppl* **30-31**, 304-311 (1998).
114. Corr, M., Lee, D. J., Carson, D. A. & Tighe, H. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J. Exp. Med.* **184**, 1555-1560 (1996).

115. Iwasaki, A., Torres, C. A., Ohashi, P. S., Robinson, H. L. & Barber, B. H. The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. *J. Immunol.* **159**, 11-14 (1997).
116. Fu, T. M. *et al.* Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol. Med.* **3**, 362-371 (1997).
117. Condon, C., Watkins, S. C., Celluzzi, C. M., Thompson, K. & Falo, L. D., Jr. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat. Med.* **2**, 1122-1128 (1996).
118. Iwasaki, A., la Cruz, C. S., Young, A. R. & Barber, B. H. Epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by minigene DNA immunization. *Vaccine* **17**, 2081-2088 (1999).
119. Casares, S., Inaba, K., Brumeanu, T. D., Steinman, R. M. & Bona, C. A. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J. Exp. Med.* **186**, 1481-1486 (1997).
120. Doe, B., Selby, M., Barnett, S., Baenziger, J. & Walker, C. M. Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 8578-8583 (1996).
121. Sato, Y. *et al.* Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* **273**, 352-354 (1996).
122. Klinman, D. M., Barnhart, K. M. & Conover, J. CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine* **17**, 19-25 (1999).
123. Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J. & Krieg, A. M. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 2879-2883 (1996).
124. Roman, M. *et al.* Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat. Med.* **3**, 849-854 (1997).
125. Sparwasser, T. *et al.* Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2045-2054 (1998).
126. Gu, S. Y. *et al.* First EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. *Dev. Biol. Stand.* **84**, 171-177 (1995).
127. Ertl, H. C. & Xiang, Z. Q. Genetic immunization. *Viral Immunol.* **9**, 1-9 (1996).
128. Degano, P., Sarphe, D. F. & Bangham, C. R. Intradermal DNA immunization of mice against influenza A virus using the novel PowderJect system. *Vaccine* **16**, 394-398 (1998).

129. Cheng, L., Ziegelhoffer, P. R. & Yang, N. S. In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 4455-4459 (1993).
130. Barry, M. A. & Johnston, S. A. Biological features of genetic immunization. *Vaccine* **15**, 788-791 (1997).
131. Larregina, A. T. *et al.* Direct transfection and activation of human cutaneous dendritic cells. *Gene Ther.* **8**, 608-617 (2001).
132. Akbari, O. *et al.* DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J. Exp. Med.* **189**, 169-178 (1999).
133. Porgador, A. *et al.* Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8<sup>+</sup> T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med.* **188**, 1075-1082 (1998).
134. Mendiratta, S. K. *et al.* Therapeutic tumor immunity induced by polyimmunization with melanoma antigens gp100 and TRP-2. *Cancer Res.* **61**, 859-863 (2001).
135. Densmore, C. L. *et al.* Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Mol. Ther.* **1**, 180-188 (2000).
136. Feltquate, D. M., Heaney, S., Webster, R. G. & Robinson, H. L. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J. Immunol.* **158**, 2278-2284 (1997).
137. Hanke, T. *et al.* Effective induction of HIV-specific CTL by multi-epitope using gene gun in a combined vaccination regime. *Vaccine* **17**, 589-596 (1999).
138. Chow, Y. H. *et al.* Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *J. Immunol.* **160**, 1320-1329 (1998).
139. Charo, J. *et al.* A long-term memory obtained by genetic immunization results in full protection from a mammary adenocarcinoma expressing an EBV gene. *J. Immunol.* **163**, 5913-5919 (1999).
140. Geissler, M., Gesien, A., Tokushige, K. & Wands, J. R. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J. Immunol.* **158**, 1231-1237 (1997).
141. Gerloni, M., Lo, D., Ballou, W. R. & Zanetti, M. Immunological memory after somatic transgene immunization is positively affected by priming with GM-CSF and does not require bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **28**, 1832-1838 (1998).
142. Geissler, M., Schirmbeck, R., Reimann, J., Blum, H. E. & Wands, J. R. Cytokine and hepatitis B virus DNA co-immunizations enhance cellular and humoral immune responses to the middle but not to the large hepatitis B virus surface antigen in mice. *Hepatology* **28**, 202-210 (1998).

143. Rakhmievich, A. L. *et al.* Effective particle-mediated vaccination against mouse melanoma by coadministration of plasmid DNA encoding Gp100 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin. Cancer Res.* **7**, 952-961 (2001).
144. Xiang, Z. & Ertl, H. C. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity.* **2**, 129-135 (1995).
145. Kim, J. J. *et al.* Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. *Eur. J. Immunol.* **28**, 1089-1103 (1998).
146. Hawkins, W. G. *et al.* Immunization with DNA coding for gp100 results in CD4 T-cell independent antitumor immunity. *Surgery* **128**, 273-280 (2000).
147. Leitner, W. W., Ying, H., Driver, D. A., Dubensky, T. W. & Restifo, N. P. Enhancement of tumor-specific immune response with plasmid DNA replicon vectors. *Cancer Res.* **60**, 51-55 (2000).
148. Dessureault, S., Graham, F. & Gallinger, S. B7-1 gene transfer into human cancer cells by infection with an adenovirus-B7 (Ad-B7) expression vector. *Ann. Surg. Oncol.* **3**, 317-324 (1996).
149. Corr, M. *et al.* Costimulation provided by DNA immunization enhances antitumor immunity. *J. Immunol.* **159**, 4999-5004 (1997).
150. Kutzler, M. A. & Weiner, D. B. Developing DNA vaccines that call to dendritic cells. *J. Clin. Invest* **114**, 1241-1244 (2004).
151. McKay, P. F. *et al.* Recruitment of different subsets of antigen-presenting cells selectively modulates DNA vaccine-elicited CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte responses. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1011-1020 (2004).
152. Sin, J., Kim, J. J., Pachuk, C., Satishchandran, C. & Weiner, D. B. DNA vaccines encoding interleukin-8 and RANTES enhance antigen-specific Th1-type CD4(+) T-cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 in vivo. *J. Virol.* **74**, 11173-11180 (2000).
153. Chen, C. H. *et al.* Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. *Cancer Res.* **60**, 1035-1042 (2000).
154. Hung, C. F. *et al.* Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. *Cancer Res.* **61**, 3698-3703 (2001).
155. You, Z., Huang, X., Hester, J., Toh, H. C. & Chen, S. Y. Targeting dendritic cells to enhance DNA vaccine potency. *Cancer Res.* **61**, 3704-3711 (2001).

156. Chattergoon, M. A. *et al.* Targeted antigen delivery to antigen-presenting cells including dendritic cells by engineered Fas-mediated apoptosis. *Nat. Biotechnol.* **18**, 974-979 (2000).
157. Sasaki, S., Amara, R. R., Oran, A. E., Smith, J. M. & Robinson, H. L. Apoptosis-mediated enhancement of DNA-raised immune responses by mutant caspases. *Nat. Biotechnol.* **19**, 543-547 (2001).
158. Cayeux, S. *et al.* Direct and indirect T cell priming by dendritic cell vaccines. *Eur. J. Immunol.* **29**, 225-234 (1999).
159. Lyman, S. D. Biology of flt3 ligand and receptor. *Int. J. Hematol.* **62**, 63-73 (1995).
160. Brasel, K. *et al.* Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood* **88**, 2004-2012 (1996).
161. Papayannopoulou, T., Nakamoto, B., Andrews, R. G., Lyman, S. D. & Lee, M. Y. In vivo effects of Flt3/Flk2 ligand on mobilization of hematopoietic progenitors in primates and potent synergistic enhancement with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **90**, 620-629 (1997).
162. Maraskovsky, E. *et al.* Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* **184**, 1953-1962 (1996).
163. Lynch, D. H. *et al.* Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* **3**, 625-631 (1997).
164. Esche, C., Subbotin, V. M., Maliszewski, C., Lotze, M. T. & Shurin, M. R. FLT3 ligand administration inhibits tumor growth in murine melanoma and lymphoma. *Cancer Res.* **58**, 380-383 (1998).
165. Lebsack ME, McKenna HJ, Hoek JA & al. Safety of flt3-Ligand in healthy volunteers. *Blood* 90 (suppl 1):751a, 1997.
166. Maraskovsky E, Roux E, Teepe M & al. Flt3-Ligand increases peripheral blood dendritic cells in healthy volunteers. *Blood* 90 (suppl 1):2585a, 1997.
167. Gosset, W. S. The probable error of a mean. *Biometrika* 6 (1): 1-25. 1908.
168. Oughton, J. A. & Kerkvliet, N. I. Novel phenotype associated with in vivo activated CTL precursors. *Clin. Immunol.* **90**, 323-333 (1999).
169. Amara, R. R. *et al.* Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Vaccine* **20**, 1949-1955 (2002).
170. Barouch, D. H. *et al.* Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* **290**, 486-492 (2000).

171. Kirman, J. R. & Seder, R. A. DNA vaccination: the answer to stable, protective T-cell memory? *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 471-476 (2003).
172. Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D. & Gabrilovich, D. I. Antigen-specific inhibition of CD8<sup>+</sup> T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J. Immunol.* **172**, 989-999 (2004).
173. Maeurer, M. J. *et al.* Host immune response in renal cell cancer: interleukin-4 (IL-4) and IL-10 mRNA are frequently detected in freshly collected tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* **41**, 111-121 (1995).
174. Serafini, P. *et al.* Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 64-72 (2004).
175. Zou, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 295-307 (2006).
176. Leitner, W. W. *et al.* Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nat. Med.* **9**, 33-39 (2003).
177. Restifo, N. P., Ying, H., Hwang, L. & Leitner, W. W. The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Ther.* **7**, 89-92 (2000).
178. Rodriguez, F. & Whitton, J. L. Enhancing DNA immunization. *Virology* **268**, 233-238 (2000).
179. Sun, X., Hodge, L. M., Jones, H. P., Tabor, L. & Simecka, J. W. Co-expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with antigen enhances humoral and tumor immunity after DNA vaccination. *Vaccine* **20**, 1466-1474 (2002).
180. Zoller, M. & Christ, O. Prophylactic tumor vaccination: comparison of effector mechanisms initiated by protein versus DNA vaccination. *J. Immunol.* **166**, 3440-3450 (2001).
181. Hudak, S. *et al.* FLT3/FLK2 ligand promotes the growth of murine stem cells and the expansion of colony-forming cells and spleen colony-forming units. *Blood* **85**, 2747-2755 (1995).
182. Broxmeyer, H. E. *et al.* Flt3 ligand stimulates/costimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. *Exp. Hematol.* **23**, 1121-1129 (1995).
183. Ashihara, E. *et al.* FLT-3 ligand mobilizes hematopoietic primitive and committed progenitor cells into blood in mice. *Eur. J. Haematol.* **60**, 86-92 (1998).
184. Brasel, K. *et al.* Flt3 ligand synergizes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic progenitor cells into the peripheral blood of mice. *Blood* **90**, 3781-3788 (1997).

185. Sudo, Y. *et al.* Synergistic effect of FLT-3 ligand on the granulocyte colony-stimulating factor-induced mobilization of hematopoietic stem cells and progenitor cells into blood in mice. *Blood* **89**, 3186-3191 (1997).
186. Peretz, Y., Zhou, Z. F., Halwani, F. & Prud'homme, G. J. In vivo generation of dendritic cells by intramuscular codelivery of FLT3 ligand and GM-CSF plasmids. *Mol. Ther.* **6**, 407-414 (2002).
187. D'Amico, A. & Wu, L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J. Exp. Med.* **198**, 293-303 (2003).
188. Parajuli, P. *et al.* Immunization with wild-type p53 gene sequences coadministered with Flt3 ligand induces an antigen-specific type 1 T-cell response. *Cancer Res.* **61**, 8227-8234 (2001).
189. Bohm, W., Mertens, T., Schirmbeck, R. & Reimann, J. Routes of plasmid DNA vaccination that prime murine humoral and cellular immune responses. *Vaccine* **16**, 949-954 (1998).
190. Stertman, L., Strindelius, L. & Sjöholm, I. Starch microparticles as an adjuvant in immunisation: effect of route of administration on the immune response in mice. *Vaccine* **22**, 2863-2872 (2004).
191. Pertmer, T. M., Roberts, T. R. & Haynes, J. R. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J. Virol.* **70**, 6119-6125 (1996).
192. Sasaki, S., Takeshita, F., Xin, K. Q., Ishii, N. & Okuda, K. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. *Methods* **31**, 243-254 (2003).
193. Raz, E. *et al.* Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 5141-5145 (1996).
194. Mwangi, W. *et al.* DNA-encoded fetal liver tyrosine kinase 3 ligand and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor increase dendritic cell recruitment to the inoculation site and enhance antigen-specific CD4+ T cell responses induced by DNA vaccination of outbred animals. *J. Immunol.* **169**, 3837-3846 (2002).
195. Sailaja, G., Husain, S., Nayak, B. P. & Jabbar, A. M. Long-term maintenance of gp120-specific immune responses by genetic vaccination with the HIV-1 envelope genes linked to the gene encoding Flt-3 ligand. *J. Immunol.* **170**, 2496-2507 (2003).
196. Sumida, S. M. *et al.* Recruitment and expansion of dendritic cells in vivo potentiate the immunogenicity of plasmid DNA vaccines. *J. Clin. Invest* **114**, 1334-1342 (2004).

197. Snapper, C. M. & Paul, W. E. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **139**, 10-17 (1987).
198. Snapper, C. M. & Paul, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* **236**, 944-947 (1987).
199. Snapper, C. M., Peschel, C. & Paul, W. E. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **140**, 2121-2127 (1988).
200. Liu, Y., Huang, H., Chen, Z., Zong, L. & Xiang, J. Dendritic cells engineered to express the Flt3 ligand stimulate type I immune response, and induce enhanced cytotoxic T and natural killer cell cytotoxicities and antitumor immunity. *J. Gene Med.* **5**, 668-680 (2003).
201. Pawlowska, A. B. *et al.* In vitro tumor-pulsed or in vivo Flt3 ligand-generated dendritic cells provide protection against acute myelogenous leukemia in nontransplanted or syngeneic bone marrow-transplanted mice. *Blood* **97**, 1474-1482 (2001).
202. Hung, C. F. *et al.* Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to a gene encoding the extracellular domain of Fms-like tyrosine kinase 3-ligand. *Cancer Res.* **61**, 1080-1088 (2001).
203. Fong, C. L. & Hui, K. M. Generation of potent and specific cellular immune responses via in vivo stimulation of dendritic cells by pNGVL3-hFLex plasmid DNA and immunogenic peptides. *Gene Ther.* **9**, 1127-1138 (2002).
204. Lynch, D. H. Induction of dendritic cells (DC) by Flt3 Ligand (FL) promotes the generation of tumor-specific immune responses in vivo. *Crit Rev. Immunol.* **18**, 99-107 (1998).
205. Fong, C. L., Mok, C. L. & Hui, K. M. Intramuscular immunization with plasmid coexpressing tumour antigen and Flt-3L results in potent tumour regression. *Gene Ther.* (2005).
206. Braun, S. E. *et al.* Flt3 ligand antitumor activity in a murine breast cancer model: a comparison with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and a potential mechanism of action. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2141-2151 (1999).
207. Smith, J. R., Thackray, A. M. & Bujdoso, R. Reduced herpes simplex virus type 1 latency in Flt-3 ligand-treated mice is associated with enhanced numbers of natural killer and dendritic cells. *Immunology* **102**, 352-358 (2001).
208. Peron, J. M. *et al.* FLT3-ligand administration inhibits liver metastases: role of NK cells. *J. Immunol.* **161**, 6164-6170 (1998).
209. Kim, E. M., Sivanandham, M., Stavropoulos, C. I. & Wallack, M. K. Adjuvant effect of a Flt3 ligand (FL) gene-transduced xenogeneic cell line in a murine colon cancer model. *J. Surg. Res.* **108**, 148-156 (2002).

210. Kwon, T. K. & Park, J. W. Intramuscular co-injection of naked DNA encoding HBV core antigen and Flt3 ligand suppresses anti-HBc antibody response. *Immunol. Lett.* **81**, 229-234 (2002).
211. Yunusov, M. Y. *et al.* FLT3 ligand promotes engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells without significant graft-versus-host disease. *Transplantation* **75**, 933-940 (2003).
212. Moser, M. Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? *Immunity* **19**, 5-8 (2003).
213. Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I. L. & Manz, M. G. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* **198**, 305-313 (2003).
214. Brasel, K., De, S. T., Smith, J. L. & Maliszewski, C. R. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* **96**, 3029-3039 (2000).
215. Rasko, J. E., Metcalf, D., Rossner, M. T., Begley, C. G. & Nicola, N. A. The flt3/flk-2 ligand: receptor distribution and action on murine haemopoietic cell survival and proliferation. *Leukemia* **9**, 2058-2066 (1995).
216. George, T. C., Billsborough, J., Viney, J. L. & Norment, A. M. High antigen dose and activated dendritic cells enable Th cells to escape regulatory T cell-mediated suppression in vitro. *Eur. J. Immunol.* **33**, 502-511 (2003).
217. Robinson, H. L. DNA vaccines: basic mechanism and immune responses (Review). *Int. J. Mol. Med.* **4**, 549-555 (1999).
218. Boonstra, A. *et al.* Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J. Exp. Med.* **197**, 101-109 (2003).
219. Manickasingham, S. P., Edwards, A. D., Schulz, O. & Reis e Sousa The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *Eur. J. Immunol.* **33**, 101-107 (2003).
220. Merad, M., Sugie, T., Engleman, E. G. & Fong, L. In vivo manipulation of dendritic cells to induce therapeutic immunity. *Blood* **99**, 1676-1682 (2002).
221. Chen, W. *et al.* FLT3 ligand administration after hematopoietic cell transplantation increases circulating dendritic cell precursors that can be activated by CpG oligodeoxynucleotides to enhance T-cell and natural killer cell function. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **11**, 23-34 (2005).
222. Ciavarra, R. P. *et al.* Impact of the tumor microenvironment on host infiltrating cells and the efficacy of flt3-ligand combination immunotherapy evaluated in a treatment model of mouse prostate cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **52**, 535-545 (2003).

223. Oliveira, S. C. *et al.* Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**, 207-214 (1999).
224. Tuting, T., Gambotto, A., Robbins, P. D., Storkus, W. J. & DeLeo, A. B. Co-delivery of T helper 1-biasing cytokine genes enhances the efficacy of gene gun immunization of mice: studies with the model tumor antigen beta-galactosidase and the BALB/c Meth A p53 tumor-specific antigen. *Gene Ther.* **6**, 629-636 (1999).
225. Evans, T. G., Hasan, M., Galibert, L. & Caron, D. The use of Flt3 ligand as an adjuvant for hepatitis B vaccination of healthy adults. *Vaccine* **21**, 322-329 (2002).
226. McNeel, D. G. *et al.* Pilot study of an HLA-A2 peptide vaccine using flt3 ligand as a systemic vaccine adjuvant. *J. Clin. Immunol.* **23**, 62-72 (2003).
227. Viney, J. L., Mowat, A. M., O'Malley, J. M., Williamson, E. & Fanger, N. A. Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J. Immunol.* **160**, 5815-5825 (1998).
228. Pulendran, B. *et al.* Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant. *J. Exp. Med.* **188**, 2075-2082 (1998).
229. Diener, K. R., Moldenhauer, L. M., Lyons, A. B., Brown, M. P. & Hayball, J. D. Human Flt-3-ligand-mobilized dendritic cells require additional activation to drive effective immune responses. *Exp. Hematol.* **36**, 51-60 (2008).
230. Sato, M., Iwakabe, K., Kimura, S. & Nishimura, T. Functional skewing of bone marrow-derived dendritic cells by Th1- or Th2-inducing cytokines. *Immunol. Lett.* **67**, 63-68 (1999).
231. Moore, A. C., Kong, W. P., Chakrabarti, B. K. & Nabel, G. J. Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA vaccines in mice. *J. Virol.* **76**, 243-250 (2002).
232. Mosca, P. J. *et al.* Multiple signals are required for maturation of human dendritic cells mobilized in vivo with Flt3 ligand. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 546-553 (2002).

## **Lebenslauf**

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

## **Publikationen**

Westermann J., Nguyen-Hoai T., Mollweide A., Richter G., Schmetzer O., Kim H. J., Blankenstein .T, Dörken B., Pezzutto A. Flt-3 ligand as adjuvant for DNA vaccination augments immune responses but does not skew TH1/TH2 polarization. *Gene Ther.* 2004 Jul;11(13):1048-56.

## Erklärung

„Ich, Andreas Mollweide, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Flt-3L als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift