Universität Ulm
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie
Sektion für Molekulare Infektionsimmunologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. R. Marre

Charakterisierung $CD4^+$ T-Zell-vermittelter „Hilfe" für die Induktion von Antikörpern gegen schwach immunogene Antigene

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Peter Seizer

Ulm

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Reinhold Schirmbeck

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Detlef Michel

Tag der Promotion: 15.12.2005

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis 3

1. EINLEITUNG 7

1.1 Das Immunsystem 7
1.1.1 Die $CD4^+$ T-Zell-regulierte humorale Immunantwort 8
1.1.2 $CD8^+$ T-Zellen 12

1.2 Impfstoffe 14
1.2.1 Rekombinante Antigene 14
1.2.2 Adjuvantien 15
1.2.2.1 Oligodesoxynukleotide 15
1.2.2.2 Hitzeschockproteine 16
1.2.2.3 $CD4^+$ T-Helferzell-Epitope 17
1.2.3 DNA-Impfstoffe 18

1.3 Das Hepatitis D Virus als Modell für Antigene mit schwacher Immunogenität 22

1.4 Fragestellung 25

2. MATERIAL UND METHODEN 26

2.1 Chemikalien und Biochemikalien 26

2.2 Mausstämme 26

2.3 Immunisierungsvektoren 26

2.4 Zellbiologische Methoden 29
2.4.1 Zellkultur 29
2.4.1.1 Verwendete Zelllinien 29
2.4.1.2 Reagenzien und Medien 29
2.4.1.3 Kultivierung der Zelllinien 31
2.4.2 Transfektion eukaryontischer Zellen 31

2.5 Proteinbiochemische Methoden 32
2.5.1 Verwendete Antikörper 32
2.5.2 Immunpräzipitation 32
2.5.3 SDS-Page 33
2.5.4 Western Blot 34
2.5.5 Bestimmung der HDAg- und HBsAg-spezifischen Antikörper 35
2.5.5.1 Antikörper-Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 35
2.5.5.2 Antikörperbestimmung im Western Blot Verfahren 36

2.6 Zytotoxische T-Lymphozyten 36
2.6.1 Isolierung und *in vitro* Restimulation von Milzzellen 36
2.6.2 Zytotoxizitätstest (Chromfreisetzungstest) 37
2.6.3 Nachweis Antigen-spezifischer IFN-γ produzierender $CD8^+$ T-Zellen 37
2.6.4 Rattenfaktor 38

2.7 Oligodesoxynukleotide 39

2.8 Immunisierungen 39

2.9 Statistische Verfahren 39

3. ERGEBNISSE 40

3.1 Induktion von Hepatitis D Virus-spezifischen Immunantworten durch rekombinantes p24 S-HDAg Protein 40
3.1.1 Ko-Applikation von p24 S-HDAg mit immunstimulierenden, CpG-haltigen Oligodesoxynukleotiden (ODN-Hilfe) 42
3.1.2 Ko-Applikation von p24 S-HDAg mit rekombinantem HBsAg (Antigen-Hilfe) 44

3.2 HDV-spezifische DNA-Immunisierung 46
3.2.1 Identifizierung einer GFP-spezifischen Hilfsfunktion für die Induktion von HDAg-spezifischen Antikörpern 51
3.2.2 Konstruktion von HSP73-assoziierten chimären Fusionsproteinen 53

4. DISKUSSION 58

4.1 Das Hepatitis D Virus δ-Antigen 58

4.2 Charakterisierung der $CD4^+$ T-Zell-Hilfe für die Induktion von HDAg-spezifischen Antikörpern 59

4.3 Anwendung HSP73-assoziierter DNA-Vakzinen auf schwache virale Antigene 63

4.4 Die Rolle der HDV-Antikörper im Infektionszyklus 65

5. ZUSAMMENFASSUNG 66

6. LITERATUR 68

7. ANHANG 79

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

A	Adenin
Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ARM	Arginin-reiches Motiv
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	*Mycobacterium bacille-Calmette-Guerin*
β-ME	Beta-Mercaptoethanol
BFA	Brefeldin A
BSA	*Bovine serum albumin*
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CAF	$CD8^+$ T-Zell-antiviraler Faktor
Ci	Curie
CCR	Chemokinrezeptor
CD	*Cluster of Differentiation*
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
CO_2	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
cT	zytosolisches T-Ag
cT272	N-terminale 272 As des cT
d	Tag(e)
d.h.	das heißt
dH_2O	deionisiertes Wasser
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle Medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DnaJ	J-Domäne, die zelluläre Chaperone bindet
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
et al.	*et altera*
Fab	*fragment antigen binding* (Fab-Fragment der Immunglobuline)
FACS	*fluorescent activated cell sorter*
Fc	*Fragment crystallizable* (Fc-Fragment der Immunglobuline)
FCS	*Fetal calf serum*
FITC	Fluoroisothiocyanat

G	Guanin
GFP	*green fluorescent protein*
GpG	Guanin-Phosphat-Guanin
g	Gramm
h	Stunde
H-2	Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus
HBcAg	Hepatitis B Virus Core-Protein
HBS	*HEPES-buffered saline*
HBsAg	Hepatitis B Virus Oberflächenprotein
hc	*heavy chain*
hCMV	humanes Cytomegalie-Virus
HDAg	Hepatitis Delta Antigen
HDV	Hepatitis D Virus
HEK	Humane embryonale Nierenzelllinie
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HIV	*human immunodeficiency virus*
HRP	*Horseradish peroxidase*
HSP	Hitzeschockprotein
i.m.	intramuskulär
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
Kap.	Kapitel
Kat-Nr.	Katalognummer
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KO	*knock-out*
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertoni Medium
L-HDAg	*hepatitis D virus large antigen (p27)*
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
M	Molar
mAk / mAb	monoklonaler Antikörper *(antibody)*
MEM	*Minimal essential medium*
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mRNA	*messenger*-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
mV	Millivolt
NO	Stickstoffoxid

NK	natürliche Killerzelle
NP-40	Nonidet P-40
Nt	Nukleotid(e)
ODN	Oligodesoxynukleotide
OVA	Ovalbumin
p	Plasmid
PADRE	*Pan DR helper T cell epitopes*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	*Pathogen-associated molecular pattern*
PAS	Protein-A-Sepharose
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
pH	*potentia hydrogenii*
polyA	Polyadenylierungssequenz
PPO	2,5-Diphenyl-oxazol
PRR	*pattern recognition receptor*
PTO	Phosphorthioat
rad	*radiation absorbed dose*
rev	*regulator of viral gene expression*
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
S-HDAg	*hepatitis D virus small antigen (p24)*
ss	einzelsträngig
SV40	*Simian Virus 40*
T	Thymin
Tab.	Tabelle
T-Ag	großes Tumorantigen des SV 40
TAP	*transporters associated with antigen processing*
tat	*transcriptional activator*
tg	transgen
Th	T-Helferzelle
TLR	*Toll-like receptor*
TNE	Tris-NaCl-EDTA-Puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
u	*units*

v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen (in Prozent)
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen (in Prozent)
z.B.	zum Beispiel
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

1. EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Um in den Körper eindringende Fremdstoffe oder Mikroorganismen abwehren zu können, hat sich im Laufe der Evolution das Immunsystem entwickelt. Die Effektoren dieser Abwehr sind das unspezifische angeborene (*innate*) und das spezifisch erworbene (*adaptive*) Immunsystem. Ein wesentlicher Unterschied dieser beiden Mechanismen besteht darin, dass die spezifische Abwehr eine immunologische Gedächtnisfunktion gegenüber dem eingedrungenen Fremdstoff besitzt, d.h. bei einer Zweitinfektion mit dem identischen Erreger kommt es zu einer effektiven und schnellen Aktivierung der spezifischen Immunabwehr. Eine Substanz, die vom spezifischen Immunsystem erkannt werden kann, bezeichnet man als Antigen. Überwindet ein Fremdstoff oder Mikroorganismus (Antigen) die äußeren Barrieren des Körpers, so wird zuerst die angeborene Immunabwehr aktiviert. Dabei erkennen Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und natürliche Killerzellen die Erreger an allgemein vorkommenden Merkmalen, wobei unterschiedliche Rezeptoren beteiligt sind, die man zur Gruppe der „*Pattern Recognition Receptors*“ (PRR) zählt. Diese erkennen konservierte strukturelle Elemente von Pathogenen, so genannte „*pathogen-associated molecular pattern*“ (PAMP), die in der Regel die körpereigenen Zellen nicht aufweisen, als fremd. Diese PAMP, zu denen unter anderem Lipopolysaccharide, Peptidoglykane, doppelsträngige RNA und auch bakterielle DNA gehören, besitzen somit eine immunstimulierende Wirkung. Zusätzlich erfolgt die Aktivierung des spezifischen Immunsystems, das den Eindringling auf zwei Arten bekämpfen kann: die humorale Immunantwort und die zelluläre Immunantwort. Bei der humoralen Immunantwort werden von B-Zellen, die gewöhnlich durch den Fremdstoff und $CD4^+$ T-Helferzellen aktiviert wurden, Immunglobuline (Antikörper) gebildet. Diese sind präferentiell gegen antigene Determinanten des Fremdstoffes wie z.B. die bakterielle Zellwand oder die Virushülle gerichtet und ermöglichen somit die Elimination vorwiegend extrazellulär lokalisierter Erreger. Intrazelluläre Erreger werden im Wesentlichen durch die zelluläre Komponente der Immunabwehr bekämpft. Vermittelt wird diese durch $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten.

1.1.1 Die CD4$^+$ T-Zell-regulierte humorale Immunantwort

Die Effektoren der humoralen Immunantwort sind Antikörper (Immunglobuline, Ig). Sie werden von aktivierten B-Zellen produziert. Die Y-förmigen Immunglobulinmonomere lassen sich durch partiellen Papain-Verdau in drei Stücke spalten: zwei identische Fab-Fragmente, die jeweils ein Antigen binden können, und ein Fc-Fragment, das die Effektorfunktion des Antikörpers bestimmt. Insgesamt sind an der Struktur eines Immunglobulinmonomers zwei identische leichte Ketten (*light chain*) und zwei identische schwere Ketten (*heavy chain*) beteiligt. Jede Kette besitzt eine variable (V-Region) und eine konstante Region (C-Region). Die Antigen-bindenden Fab-Fragmente werden vor allem von den variablen Regionen aller vier Ketten gebildet. Das Fc-Fragment besteht aus den konstanten Regionen der beiden schweren Ketten. Nach Art ihrer schweren Kette werden die Antikörper in Isotypen eingeteilt, wobei einige wiederum in Subtypen untergliedert werden können. Es existieren fünf Isotypen von Immunglobulinen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Beim Menschen lassen sich IgG, die 80% der Immunglobuline im Serum darstellen, in vier weitere Subtypen unterteilen: IgG1 bis IgG4.

Es sind verschiedene funktionelle Wirkmechanismen von Antikörpern bekannt:

(i) Neutralisierung: Pathogene binden an Oberflächenmoleküle und Rezeptoren der Zielzelle, um in diese einzudringen. Durch Anheften der Antikörper an die Pathogene kann dies verhindert werden. Auch die Wirkung von Toxinen kann durch Antikörper neutralisiert werden.

(ii) Opsonisierung: Antikörper, die an die Oberfläche von Pathogenen binden, fördern deren Phagozytose. Dies geschieht dadurch, dass Antikörper-besetzte Pathogene von phagozytierenden Zellen über Fc- und Komplement-Rezeptoren effektiver erkannt werden.

(iii) Aktivierung von Komplement: Antikörper, die an der Oberfläche eines Pathogens oder auch einer infizierten Zelle gebunden haben, aktivieren die Proteine des Komplementsystems, die die Lyse des Pathogens bzw. der Zielzelle zur Folge haben.

(iv) Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxity*): Zielzellen, an die Antikörper gebunden haben, werden durch

natürliche Killerzellen (NK) zerstört. Der Vorgang wird ausgelöst, wenn die an einer Zielzelle gebundenen Antikörper mit den Fc-Rezeptoren einer NK in Kontakt treten.

Zusätzlich zu diesen immunologischen Effektormechanismen sind Antikörper geeignete Marker bei neoplastischen und bei infektiologischen Erkrankungen. Antikörper werden von Plasmazellen, die sich aus aktivierten B-Zellen differenzieren, produziert und sezerniert. Die Aktivierung der B-Zellen und ihre anschließende Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen verlaufen im Allgemeinen in zwei Schritten:

In der ersten Phase der humoralen Immunantwort werden extrazellulär lokalisierte (exogene) Antigene aus dem Extrazellularraum von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen. Anschließend erfolgt eine partielle Degradation der Proteinantigene in endosomalen bzw. lysosomalen Kompartimenten zu Peptiden. Heterodimere MHC-Klasse-II-Moleküle (Haupthistokompatibilitätskomplex, *major histocompatibility complex*, MHC), die im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden, durchlaufen auf ihrem Weg zur Zelloberfläche ein endosomales Kompartiment und binden dort die generierten Peptide. Diese werden assoziiert an MHC-Klasse-II-Moleküle zur Zelloberfläche transportiert und $CD4^+$ T-Lymphozyten präsentiert (Abb. 1). Die genauen Schritte dieser MHC-Klasse-II-restringierten Antigenpräsentation sind bekannt (Übersichtsartikel: [29]). Durch die Interaktion zwischen der APZ und der T-Zelle wird die $CD4^+$ T-Zelle für das Antigen aktiviert.

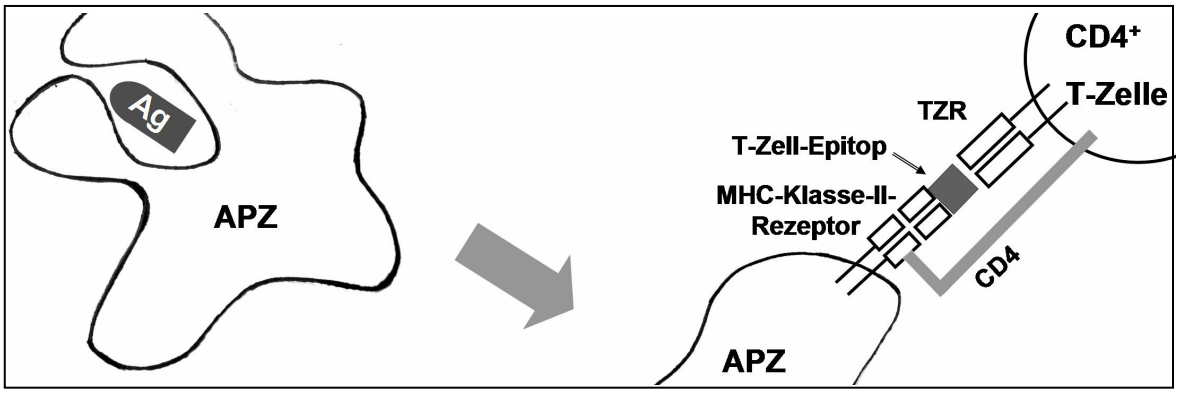

Abb. 1: Erste Phase der humoralen Immunantwort.
Eine Antigen-präsentierende Zelle (APZ) nimmt ein Antigen (Ag) auf und präsentiert anschließend Teilbereiche (T-Zell-Epitope) einer $CD4^+$ T-Zelle über den MHC-Klasse-II-Rezeptor. Die $CD4^+$ T-Zelle, die über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) die T-Zell-Epitope erkennt, ist daraufhin für das Antigen sensibilisiert.

In der zweiten Phase der humoralen Immunantwort erkennt eine B-Zelle das Antigen über ihren B-Zell-Rezeptor. Nach Internalisierung und exogener Prozessierung des Antigens werden von der B-Zelle Teile des Antigens als MHC-Klasse-II-Peptidkomplex auf der Zelloberfläche präsentiert. Erkennt nun eine $CD4^+$ T-Zelle, die zuvor von einer APZ für den gleichen Antigenkomplex aktiviert wurde, auf einer B-Zelle MHC-Klasse-II-Peptidkomplexe, die aus der Degradation des gleichen Antigenkomplexes stammen, so wird die B-Zelle durch die $CD4^+$ T-Zelle aktiviert (Abb. 2A). Durch die Aktivierung wird die Proliferation und anschließende Differenzierung der B-Zelle zu einer Antikörper-sezernierenden Plasmazelle stimuliert (Abb. 2B). Die beiden Zellen müssen dabei nicht dasselbe Epitop erkennen. Es ist vielmehr entscheidend, dass die erkannten Epitope dem gleichen Antigenkomplex wie z.B. einem Virus entstammen. Dies wird als gekoppelte Erkennung (*linked recognition*) bezeichnet. An der Interaktion der beiden Zellen sind entscheidend der CD40-Ligand auf der T-Zelle und CD40 auf der B-Zelle beteiligt. Durch die Interaktion weiterer Ligandenpaare und die gezielte Freisetzung von Interleukinen aktiviert die T-Zelle die B-Zelle. Das dabei freigesetzte Interleukinprofil der $CD4^+$ T-Helferzelle beeinflusst den Isotyp der sezernierten Antikörper. Anhand des freigesetzten Interleukinprofils werden grundsätzlich zwei Arten von $CD4^+$ T-Zellen unterschieden:

Im Mausmodell können sich native $CD4^+$ T-Zellen (Th0) unter dem Einfluss verschiedener Umgebungsvariablen, die vor allem von dendritischen Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen beeinflusst werden, entweder zu Helferzellen vom Typ 1 (Th1) oder zu Helferzellen vom Typ 2 (Th2) differenzieren. Th1-Helferzellen sind dadurch charakterisiert, dass sie vor allem Interferon-γ (IFN-γ) und Interleukin-2 (IL-2) sezernieren. Durch dieses Zytokin-Milieu werden Makrophagen aktiviert und B-Zellen zur Produktion von Antikörpern des Subtyps IgG2 stimuliert [31]. Durch Th1-polarisierte $CD4^+$ T-Zellen wird zudem auch die Prägung zytotoxischer $CD8^+$ T-Lymphozyten gefördert.

Th2-Helferzellen sind darauf spezialisiert, B-Zellen zu stimulieren. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie überwiegend IL-4 und IL-5 sezernieren. Unter diesem Zytokin-Milieu werden dabei von den B-Zellen präferentiell IgG1-Antikörper produziert.

Welche Art von T-Helferzellen (Th1 oder Th2) durch einen eingedrungenen Fremdstoff überwiegend stimuliert wird, kann somit am Zytokin-Profil der $CD4^+$ T-Lymphozyten (IFN-γ versus IL-4) und am Isotyp der gebildeten Antigen-spezifischen Antikörper (IgG2 versus IgG1) unterschieden werden.

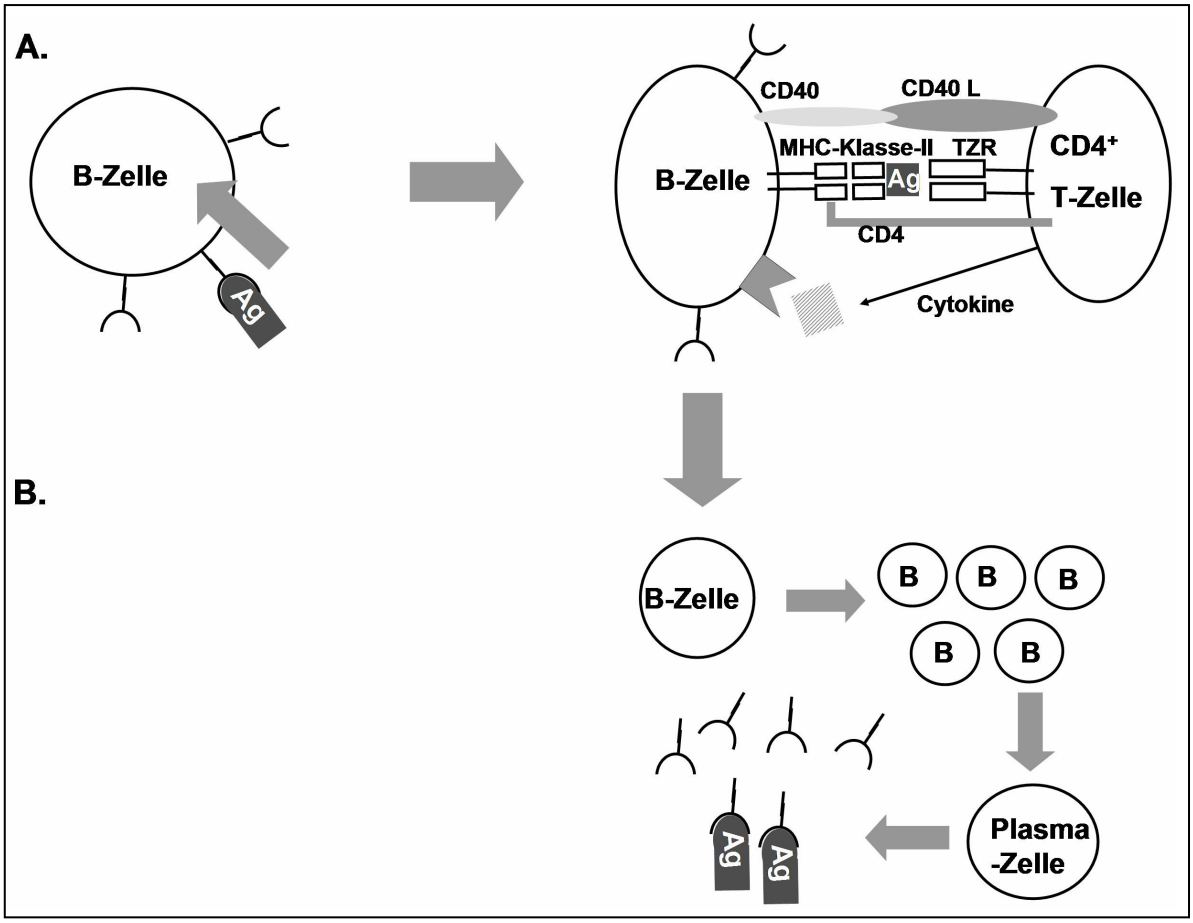

Abb. 2: Zweite Phase der humoralen Immunantwort.
A) Ein B-Zell-Epitop des Antigens (Ag) hat auf dem Rezeptor einer B-Zelle gebunden und wird daraufhin von der B-Zelle internalisiert. Nach Verarbeitung über den exogenen Prozessierungsweg werden die degradierten Peptide des Antigens (T-Zell-Epitope) assoziiert an MHC-Klasse-II-Rezeptoren auf der Zelloberfläche präsentiert. Treten eine für das Antigen sensibilisierte $CD4^+$ T-Zelle über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) und die B-Zelle in Kontakt, so wird die B-Zelle aktiviert. Wesentlich daran beteiligt sind Cytokine, CD40 auf der B-Zelle und der CD40-Ligand (CD40L) auf der T-Zelle.
B) Die aktivierte B-Zelle proliferiert, und die neu entstandenen B-Zellen (B) differenzieren sich zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Die Antikörper sind dabei vor allem gegen das Epitop gerichtet, das anfangs auf dem B-Zell-Rezeptor gebunden hat.

1.1.2 $CD8^+$ T-Zellen

$CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) stellen eine effiziente Immunantwort gegen intrazellulär lokalisierte Erreger dar, indem sie z.B. virusinfizierte Zellen erkennen und eliminieren. Über ihre Antigenrezeptoren erkennen T-Zellen Komplexe aus Peptiden des Pathogens und einem daran gebundenen MHC-Molekül auf der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle (APZ). Daher muss ein Antigen, damit es von einer T-Zelle erkannt werden kann, von einer APZ prozessiert werden. Bei der Antigenprozessierung wurden in den letzten Jahren zwei Wege definiert:

(i) MHC-Klasse-II-restringierte Prozessierung (Präsentation exogener Antigene): Die in Kapitel 1.1.1 beschriebene Präsentation exogener Antigene erfolgt über MHC-Klasse-II-Rezeptoren. $CD4^+$ T-Zellen werden selektiv von MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexen stimuliert [24; 28; 29; 67; 104; 105].

(ii) MHC-Klasse-I-restringierte Prozessierung (Präsentation endogener Antigene): Im Zytosol einer APZ wird das Proteinantigen (z.B. Virusbestandteile) synthetisiert und für die Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen durch eine multikatalytische Protease, dem Proteasom, degradiert [5]. Die generierten Peptide (8-10 As) werden anschließend über TAP-1 und TAP-2 (*transporters associated with antigen processing)* in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums transportiert [64; 98] und dort auf die MHC-Klasse-I-Moleküle geladen [81]. Durch die Bindung des Peptids auf MHC-Klasse-I-Molekülen wird der MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex vollständig gefaltet, stabilisiert und vom TAP-Komplex gelöst. Über den Golgi-Apparat werden die MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche transportiert und $CD8^+$ T-Lymphozyten präsentiert [34]. Neben diesem „klassischen“ Weg der Antigenprozessierung gibt es Hinweise darauf, dass einige rekombinante (exogene) bakterielle und virale Antigene $CD8^+$ T-Zellen induzieren [119; 120]. Auch virale Lipoproteinpartikel wie z.B. das rekombinante HBsAg sensibilisieren sehr effizient $CD8^+$ T-Zellen [91].

$CD8^+$ ZTL erkennen und eliminieren über verschiedene Effektormechanismen Zellen, die fremde Peptide von zytosolischen Pathogenen wie z.B. Viren auf ihren MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren. Die Stimulierung der $CD8^+$ ZTL erfolgt spezifisch durch eine MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation [67].

Virusinfizierte Zellen werden von $CD8^+$ ZTL auf verschiedene Weise eliminiert: Zum einen können zytotoxische Proteine wie Perforine und Granzyme, die zum Absterben der Zielzelle führen, von den ZTL freigesetzt werden. Zum anderen können von den ZTL IFN-γ und andere antivirale Faktoren sezerniert werden, die die virale Replikation hemmen, die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen stimulieren oder zur Aktivierung von Makrophagen beitragen.

1.2 Impfstoffe

Durch einen Impfstoff soll in einem Organismus gezielt eine Immunreaktion gegen einen definierten Bestandteil eines Pathogens hervorgerufen werden. Bei extrazellulären Erregern (z.B. Bakterien) stellen Antikörper den wichtigsten Schutz dar, während bei intrazellulär lokalisierten Erregern $CD8^+$ T-Lymphozyten induziert werden müssen.

1.2.1 Rekombinante Antigene

Bei der Immunisierung mit rekombinanten Proteinen werden Proteinbestandteile des Erregers in heterologen Expressionssystemen produziert und als rekombinante Spalt-Vakzine appliziert. Ein Vorteil dieser Immunisierungsmethode liegt darin, dass definierte Erregerbestandteile für die Vakzine zur Anwendung kommen, durch die eine schützende Immunität gegen den Erreger hervorgerufen wird. Durch die Zugabe von Adjuvantien zu den Proteinen besteht die Möglichkeit die Immunogenität der rekombinanten Proteine zu steigern. Rekombinant generierte Proteine lassen sich mit verschiedenen Expressionssystemen in großen Mengen produzieren, wobei darauf geachtet werden muss, dass die antigenen Eigenschaften des Proteins nicht verändert werden, z.B. durch das Fehlen von posttranslationalen Modifikationen bei prokaryontischen Expressionssystemen.

Nach Applikation der rekombinanten Proteine in den Organismus werden sie in der Regel über den exogenen Prozessierungsweg verarbeitet. Dadurch induzieren Impfstoffe mit rekombinanten Antigenen präferentiell eine Th2-polarisierte Immunantwort. Sie sind potente Induktoren der humoralen Immunantwort. Durch die Zugabe geeigneter Adjuvantien lassen sich durch sie aber auch effizient $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten induzieren und die Polarisierung der Immunantwort in Richtung Th1 verschieben. Es gibt auch einige rekombinante Proteine wie z.B. HBcAg, die ohne die Zugabe von Adjuvantien Th1-polarisierte Immunantworten auslösen und effizient $CD8^+$ T-Lymphozyten induzieren [84].

Bekanntester und auch erster auf gentechnische Weise hergestellter Impfstoff ist die Hepatitis B Vakzine. Dabei wird in Hefe exprimiertes Oberflächenprotein

(HBsAg) gemeinsam mit Aluminiumhydroxid als Adjuvans injiziert. Ein ausreichender Impfschutz ist gewöhnlich nach drei Immunisierungen erreicht. Der Impferfolg wird durch Messung der HBsAg-spezifischen Antikörper im Serum gemessen.

1.2.2 Adjuvantien

1.2.2.1 Oligodesoxynukleotide

Die immunstimulierende Wirkung von DNA ist abhängig von speziellen Basensequenzen, den so genannten CpG-Motiven. Diese Eigenschaft macht man sich zu Nutze, indem man einzelsträngige Oligodesoxynukleotide (ODN), die zur Stabilisierung mit einem Nuklease-resistenten Phosphorthioat-Rückgrat versehen sind, Vakzinen als Adjuvans hinzufügt. Eine effiziente Aktivierung des Immunsystems erfolgt im Versuchstier mit ODN nur, wenn die CpG-Motive mindestens ein nicht-methyliertes CpG-Dinukleotid besitzen, das 5´ von zwei Purinen und 3´ von zwei Pyrimidinen flankiert wird. Diese Eigenschaften weist vor allem prokaryontische DNA auf. Eukaryontische DNA enthält grundsätzlich sehr wenig CpG-Motive und die Cytosine sind methyliert [49; 117]. Der Adjuvans-Effekt der ODN wird von ihrer Sequenz beeinflusst, wobei Unterschiede zwischen humanem und murinem System bekannt sind.

Am immunstimulierenden Effekt der ODN ist wesentlich ihre Interaktion mit dem TLR9-Rezeptor beteiligt. Diese Interaktion kann nur von ODN mit CpG-Motiven eingegangen werden [102]. Folglich zeigen ODN ohne CpG-Motive keinen immunstimulierenden Effekt. Die Interaktion von CpG-haltigen ODN und TLR9 resultiert über eine Signalkaskade in einer verstärkten Freisetzung von TNF-α, IL-1β, Plasminogen-Aktivator Inhibitor-2, IL-6, IL-12, Typ I Interferon und einer verstärkten Expression von MHC-Klasse-II-Rezeptoren, CD80, CD86, CCR7 und CD40, die kostimulatorische und Antigen-präsentierende Funktion besitzen [2]. Dadurch wird das angeborene Immunsystem effizient aktiviert. Vor allem in B-Zellen und dendritischen Zellen weist der TLR9-Rezeptor, der aus der Familie der *Pattern Recognition Receptors* stammt, eine hohe Expression auf.

Zahlreiche Studien belegen in unterschiedlichen Systemen die Adjuvans-Aktivität von CpG-haltigen ODN durch Ko-Immunisierung mit rekombinanten Proteinen, Polysacchariden, bakteriellen Toxoiden, Peptiden und kommerziell erhältlichen Vakzinen. In diesen wird auch beschrieben, dass durch die CpG-haltigen ODN präferentiell eine Th1-polarisierte Immunantwort mit IgG2-Antikörpern und $CD8^+$ ZTL induziert wird [20; 21; 39; 54; 66; 72; 92; 108; 113; 114].

1.2.2.2 Hitzeschockproteine

Stressproteine (Hitzeschockproteine, HSP) kommen ubiquitär sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Zellen vor. Sie stellen eine sehr heterogene, aber hochkonservierte Gruppe von Proteinen dar [56]. Das Binden von HSP-Molekülen an Oberflächenrezeptoren [6; 96; 97] stimuliert die Reifung von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) und Makrophagen und veranlasst die Wanderung der APZ in die Lymphknoten. Desweiteren bewirken HSP die Freisetzung von IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-12, IL-15, IFN-γ und β-Chemokinen [74; 101; 103]. Als beteiligte Rezeptoren werden TLR2, TLR4, CD14, CD40, CD36, CD91 diskutiert. Zudem können HSP außer an APZ auch an natürliche Killerzellen und T-Zellen binden [9; 65]. Durch diese beschriebenen Eigenschaften stellen HSP potente natürliche Adjuvantien dar.
Wird ein Antigen assoziiert an HSP70 oder HSP90 appliziert, so verbessern die Hitzeschockproteine die Prozessierung der Antigene und die Präsentation von Epitopen durch MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle [52; 62; 68; 75].
Peptide können *in vitro* auf HSP-Moleküle geladen werden. Zuvor müssen allerdings die mit den HSP-Molekülen natürlicherweise assoziierten Proteine oder Peptide entfernt werden. Dies kann durch eine Denaturierung der HSP-Moleküle bei 50 °C und eine anschließende Renaturierung in Anwesenheit der exogenen Peptide erreicht werden. Es sind zahlreiche erfolgreiche Immmunisierungs-versuche mit Hitzeschockproteinen bekannt, bei denen Antigene auf HSP-Moleküle geladen wurden [25; 106].

1.2.2.3 $CD4^+$ T-Helferzell-Epitope

Sowohl bei der Induzierung von humoralen als auch zellulären Immunantworten spielen $CD4^+$ T-Lymphozyten eine wichtige Rolle. Für eine effiziente humorale Immunantwort müssen neben den B-Zellen auch die $CD4^+$ T-Lymphozyten ausreichend aktiviert werden. Peptide sind in der Regel nicht in der Lage, $CD4^+$ T-Zellen ausreichend zu stimulieren. Eine Möglichkeit, die $CD4^+$ T-Zellen spezifisch zu stimulieren, besteht darin, Proteine mit Helfer-Epitopen hinzuzufügen, die eine $CD4^+$ T-Zell-Hilfe hervorrufen können. Für Peptidantigene konnte dabei gezeigt werden, dass zwischen dem B-Zell-Epitop und dem Epitop, das die $CD4^+$ T-Zell-Hilfe induziert, keine kovalente Bindung vorhanden sein muss, um effizient Antikörper gegen das B-Zell-Epitop hervorzurufen [73; 86; 94]. Ferner wurde beobachtet, dass das Potential eines Proteins, $CD4^+$ T-Zell-Hilfe zu induzieren, mit seiner eigenen Immunogenität korreliert [11]. Bei einigen nativen Proteinen wie z.B. OVA, HBsAg und HBcAg konnten $CD4^+$ T-Zell-Epitope, die eine $CD4^+$ T-Zell-Hilfe hervorrufen, identifiziert werden [7; 12; 63]. Zudem wurden auch artifizielle Peptide wie z.B. PADRE (*Pan DR helper T cell epitopes*) entwickelt, die auch für zelluläre Immunantworten effizient eine $CD4^+$ T-Zell-Hilfe induzieren können [3; 4]. In letzter Zeit wurde in diesem Zusammenhang auch das *green fluorescent protein* (GFP) näher untersucht. Es wurde ursprünglich dazu eingesetzt, transfizierte Zellen besser beobachten und selektionieren zu können. Verschiedenen DNA-basierte Immunisierungsstudien, in denen vor allem spezifische $CD8^+$ T-Zell-Epitope an GFP fusioniert wurden, weisen darauf hin, dass GFP in der Lage ist, effizient $CD4^+$ T-Zellen zu aktivieren und infolgedessen eine Immunantwort gegen die fusionierten Peptide und Proteine zu verbessern [82; 99; 118].

1.2.3 DNA-Impfstoffe

Antigen-spezifische Immunantworten können mit der auf Plasmid-DNA basierenden Immunisierungsmethode sehr effizient induziert werden (Übersichtsartikel: [23; 33; 93; 107]). Bei dieser Immunisierungsmethode werden Gene, die für ein Antigen kodieren, in eukaryontische Expressionsplasmide kloniert. Anschließend wird diese DNA direkt in den Organismus appliziert. Der Vektor hat meist eine Größe von 2 bis 8 kb und besteht üblicherweise aus zwei Einheiten (Abb. 3):

(i) aus der bakteriellen Produktionseinheit, die den bakteriellen Replikationsursprung zur Plasmidamplifikation und Marker für die prokaryontische Selektion (antibiotische Resistenzgene z.B. für Ampicillin oder Kanamycin) und/ oder eukaryontische Selektion (z.B. Neomycin) enthält.

(ii) aus der Expressionseinheit, die die Antigen-kodierende DNA, geeignete Promotor/ Verstärker-Sequenzen und mRNA-stabilisierende Faktoren wie Polyadenylierungssequenzen (polyA) und Introns enthält.

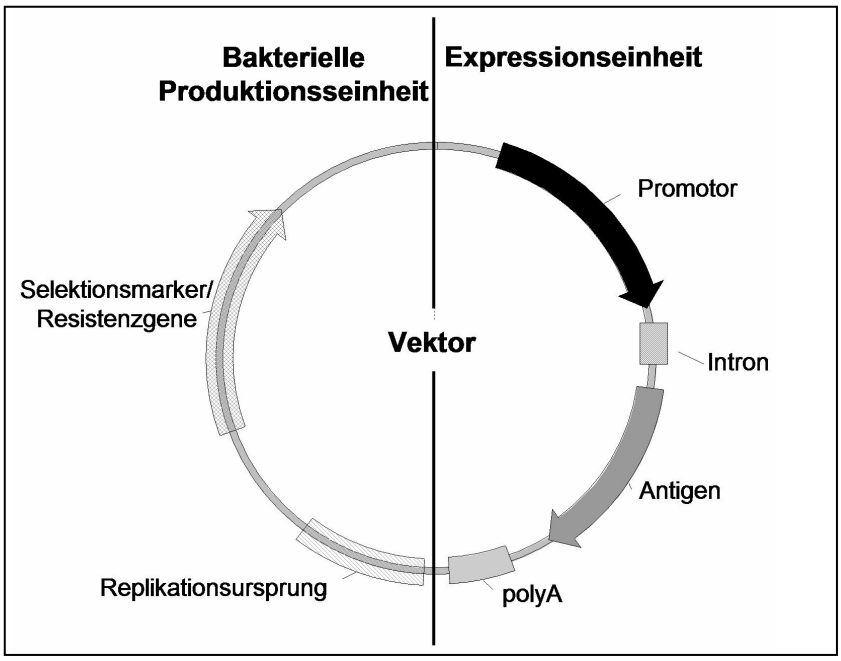

Abb. 3: Grundstruktur eines konventionellen Expressionsplasmids.
Dieses besteht aus der Expressionseinheit mit Promotor, Intron, Antigen und Polyadenylierungssequenz (polyA) und der bakteriellen Produktionseinheit mit bakteriellem Replikationsursprung und Selektionsmarker.

Durch DNA-Vakzinen werden im präklinischen Mausmodell effizient humorale und zelluläre Immunantworten induziert. Zudem besitzen sie gegenüber anderen Impfstoffen den Vorteil, dass sie einfach konstruiert werden können und eine hohe biologische Stabilität besitzen. Wird eine hohe Dosis von Plasmid-DNA (50-100 µg) intramuskulär oder subkutan appliziert, wird das DNA-kodierte Antigen von *in vivo* transient transfizierten Kerationzyten und Myozyten produziert und anschließend von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen (*Cross Priming)*. Von diesen wird dann eine meist Th1-polarisierte Immunantwort mit hohen IgG2-Antikörpern und zytotoxischen T-Lymphozyten geprägt [1; 19]. Im Gegensatz dazu wird präferentiell eine Th2-polarisierte Immunantwort induziert, wenn mit der *Gene Gun*-Technik eine niedrige Dosis Plasmid-DNA (0.1-1.0 µg) intradermal appliziert wird. Durch diese Applikationsweise werden direkt dendritische Zellen der Haut (Langerhanszellen) transient transfiziert. Daraufhin produzieren, prozessieren und präsentieren diese das DNA-kodierte Antigen [80]. Die für diese unterschiedlichen Immunantworten verantwortlichen Faktoren sind nicht bekannt. Die meisten DNA-Vakzinen enthalten bakterielle Sequenzen (z.B. Resistenzgene oder den bakteriellen Replikationsursprung), die für die Klonierung und Produktion der Plasmide nötig sind. Diese bakterielle DNA enthält spezifische CpG (Cytosin-Phosphat-Guanin)-Motive, die eine Steigerung der Immunogenität bewirken können. So kann der Austausch des Kanamycin-Resistenzgens gegen das CpG-reichere Ampicillin-Resistenzgen zu einem Anstieg der Antikörpertiter und der ZTL-Aktivität nach Immunisierung mit dem Plasmid führen [87]. Ebenso kann das Hinzufügen von zusätzlichen CpG-Motiven eine Steigerung der induzierten Immunantwort bewirken [45; 48; 85]. Daher besitzen die meisten DNA-Impfstoffe an sich einen adjuvanten Effekt.

Ähnlich wie bei anderen Vakzinen lässt sich die Immunogenität von DNA-Vakzinen auf unterschiedliche Weise modulieren. Eine Steigerung der Immunogenität kann unter anderem dadurch erreicht werden, dass die Plasmid-DNA an Partikel gekoppelt oder die Antigen-kodierende DNA mit Zytokin-DNA gemischt wird [42; 43; 59; 71; 95; 116]. Ebenso kann durch die Generierung von DNA, die für Fusionskonstrukte kodiert, die Immunogenität gesteigert werden. Dabei werden der Antigen-kodierenden DNA Sequenzen hinzugefügt, die für

kostimulatorische Moleküle [10] wie Zytokingene [44; 58] oder Stressproteine [17; 18; 57; 100] kodieren.

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein System für DNA-Impfstoffe entwickelt, mit dem sich chimäre Proteine, die N-terminal aus einer HSP73-bindenden DnaJ-Domäne und C-terminal aus der Antigendomäne bestehen, exprimieren lassen. Hervorgegangen ist das System aus dem 708 As großen T-Antigen des *Simian Virus 40* (SV40). Auf den N-terminalen 272 Aminosäuren des zytosolischen T-Antigens (cT272, Abb. 4A) befindet sich eine homologe DnaJ-Domäne. Das DnaJ-Molekül stammt aus der Familie der 40 kD Hitzeschockproteine, bindet HSP70 Moleküle und reguliert deren Aktivität. Mit seiner homologen DnaJ-Domäne besitzt das cT272 eine Substratbindungsstelle, an der konstitutiv exprimiertes HSP73 unter Hydrolyse von ATP gebunden wird. Somit kann das cT272 mit seiner homologen DnaJ-Domäne einen stabilen Komplex mit ADP-gebundenem HSP73 bilden.

Werden eukaryontische Zellen mit DNA, die für das cT272 kodiert, transfiziert, so akkumulieren durch die stabile Interaktion von HSP73 und cT272-Fragmenten HSP73-assoziierte zytosolische cT272-Komplexe in den Zellen [88; 89]. Fusioniert man Proteine oder Proteindomänen C-terminal an das cT272, so resultiert dies in einer HSP73-assoziierten Expression chimärer Fusionskonstrukte (Abb. 4B). Schon über 30 verschiedene Antigene, die in herkömmlichen Vektoren nicht zu exprimieren waren, konnten durch die Fusion an das cT272 als chimäre Fusionsproteine exprimiert werden. Durch Immunisierungen mit Plasmid-DNA, die für diese HSP73-assoziierten Fusionsproteine kodiert, konnten effizient sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten gegen die C-terminal fusionierten Antigendomänen induziert werden [89; 90].

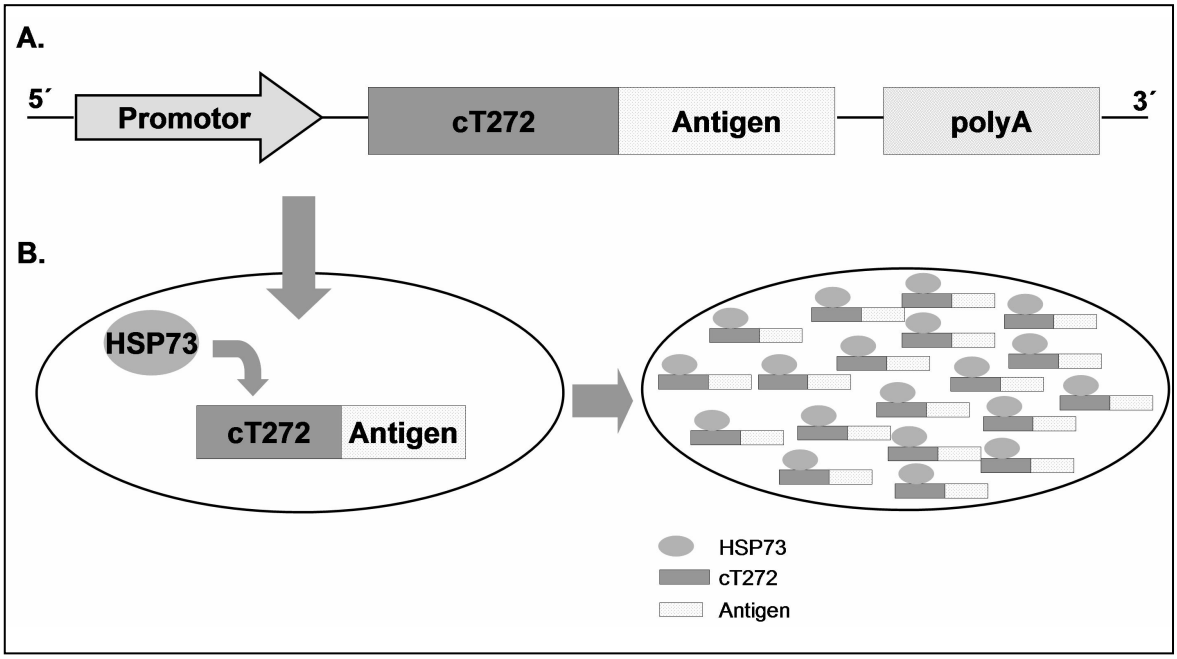

Abb. 4: HSP73-assoziiertes Expressionssystem.
A) Die Abbildung zeigt die Expressionskassette des HSP73-assoziierten (HSP, Hitzeschockprotein) Expressionssystems. Sie besteht aus einem Promotor, einem fakultativen Intron, den N-terminalen 272 Aminosäuren des zytosolischen SV40 T-Antigens (cT272) mit seiner HSP73-Bindungsstelle, dem Antigen und einer Polyadenylierungssequenz (polyA).
B) Werden eukaryontische Zellen mit Plasmid-DNA, die die Expressionskassette des HSP73-assoziierten Expressionssystems enthält, transfiziert, so wird in den Zellen das chimäre Fusionsprotein aus cT272 und dem Antigen synthetisiert. Konstitutiv exprimiertes HSP73 bindet daraufhin an der homologen DnaJ-Domäne des cT272. Mit fortschreitender Synthese akkumulieren die HSP73-assoziierten zytosolischen cT272-Antigen-Komplexe in den Zellen.

1.3 Das Hepatitis D Virus als Modell für Antigene mit schwacher Immunogenität

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Proteine als auch Proteinfragmente des Hepatitis D Virus (HDV) als Modellantigene verwendet. Das Hepatitis D Virus wird nicht als vollständiges Virus, sondern nur als subviraler Partikel angesehen, da es für seine Freisetzung und Übertragung zwingend die Anwesenheit des Hepatitis B Virus benötigt [22]. Das HDV Genom besteht aus einzelsträngiger, zirkulärer RNA mit einer ungefähren Größe von 1,7 kb [50; 60; 112]. Zusammengesetzt ist es aus einer hypervariablen Region, der Delta-Antigen-kodierenden Region und einer Selbstschnittstelle. Das Genom ist von inverser Polarität und besitzt nur einen offenen Leserahmen [51]. HDV kann sich autonom replizieren und teilt sich keine homologen Sequenzen mit seinem Helfervirus, dem Hepatitis B Virus, was für klassische Satellitenviren untypisch ist. Infektiöse Hepatitis D Virus-Partikel sind HBsAg-Proteoliposomen, die das Hepatitis Delta Antigen enthalten, an dem die genomische RNA gebunden ist.

Die RNA des Hepatitis D Virus codiert nur für ein Protein, das Hepatitis Delta Antigen (HDAg). Dies wird in zwei Varianten exprimiert: *hepatitis D virus large antigen* p27 (L-HDAg) und *hepatitis D virus small antigen* p24 (S-HDAg). Diese beiden Varianten werden aus dem gleichen offenen Leserahmen translatiert und haben 195 Aminosäuren gemeinsam. Das L-HDAg besitzt gegenüber S-HDAg eine zusätzliche C-terminale Erweiterung um 19 Aminosäuren. Um die beiden Proteine unterschiedlicher Länge zu synthetisieren, unterzieht sich die HDV RNA einer posttranskriptionalen RNA-Editierung. Hierbei wird aus dem Stop-Kodon des S-HDAg das Kodon für die Aminosäure Tryptophan, und der offene Leserahmen wird somit um 19 Aminosäuren erweitert. Es entsteht das Protein L-HDAg [60; 112].

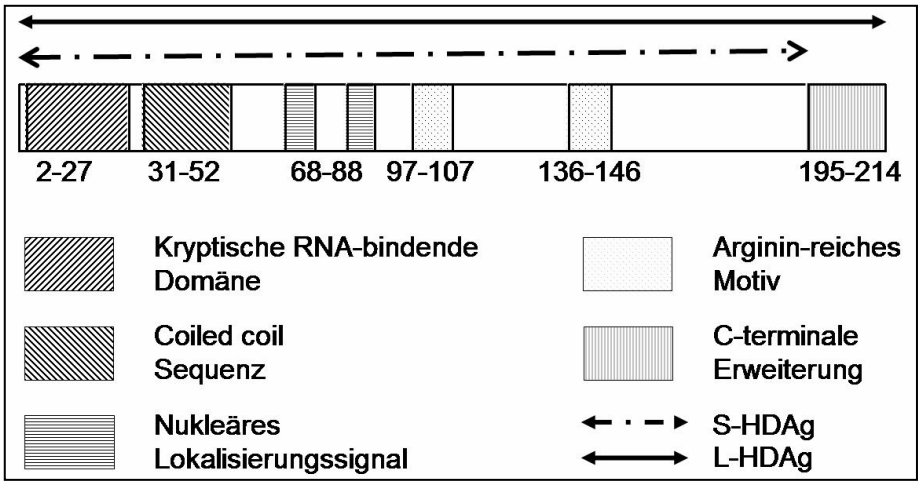

Abb. 5: Hepatitis D Virus δ-Antigen (HDAg).
Das Hepatitis D Virus δ-Antigen (HDAg) wird in zwei Varianten exprimiert: *Hepatitis D virus small antigen* (S-HDAg) und *Hepatitis D virus large antigen* (L-HDAg). Die beiden Proteinvarianten unterscheiden sich lediglich in einer 19 As umfassenden Erweiterung bei L-HDAg gegenüber S-HDAg, auf der sich das Verpackungssignal befindet.

Bei beiden HDV-Proteinen handelt es sich um multifunktionale Proteine, die ausführlich untersucht wurden. Abbildung 5 zeigt die bekannten Domänen. Nahe am N-Terminus (As 31 bis 52) befindet sich eine *coiled coil* Sequenz. Diese fungiert als Protein-Protein-Interaktionsdomäne und ermöglicht die Multimerisierung zwischen den HDV-Molekülen [15; 111; 115]. Zwei Subdomänen zwischen Aminosäure 66 und 88 enthalten ein nukleäres Lokalisierungssignal. Die RNA-bindende Domäne besteht aus zwei Arginin-reichen Regionen (ARM I und ARM II), die den Arginin-reichen Motiven anderer RNA-bindender Proteine, wie z.B. rev (*regulator of viral gene expression*) und tat (*transcriptional activator)* des HIV (*human immunodeficiency virus*), sehr ähnlich sind [53]. Zudem wurde auch eine kryptische RNA-bindende Domäne am N-terminalen Ende beschrieben [77; 78]. Auf der letzten Domäne, die nur L-HDAg besitzt, befindet sich das Verpackungssignal. Deshalb ist L-HDAg für die Generierung der Viruspartikel notwendig, während hingegen die HDV-Replikation scheinbar nur von S-HDAg unterstützt wird [14; 16]. Ferner kann L-HDAg an einem einzigen Cystein, das sich vier Aminosäuren vom seinem C-terminalen Ende entfernt befindet, isoprenyliert werden [30]. Mutiert man dieses Cystein zu Serin, so kann dies die Isoprenylierung und auch die Virusverpackung blockieren [30].

Beide Proteinvarianten sind schwache Immunogene für B-Zellen [61]. In DNA-Immunisierungsversuchen mit Mäusen und Murmeltieren konnten nur schwache oder keine Antikörpertiter gegen HDAg induziert werden [26; 27; 35; 36; 79].
Jedoch entwickeln Patienten, die sich entweder mit Hepatitis B und D ko-infiziert haben oder bei bereits bestehender Hepatitis B mit Hepatitis D super-infiziert haben in der Regel in beiden Fällen deutliche Antikörpertiter gegen das HDAg. Allerdings tritt hier HDAg immer in Assoziation mit HBsAg auf. Es wurden einige Epitope auf HDAg identifiziert, an die diese Antikörper binden [110]. Die funktionellen Domänen, in denen sich die Epitope befinden, beinhalten unter anderem das Kernlokalisationssignal und das erste Arginin-reiche Motiv. Zudem enthält das S-HDAg C-terminal eine einzigartige Konformation, die mit dem monoklonalen Antikörper 9E4 reagiert [37]. Die 19 Aminosäuren umfassende C-terminale Erweiterung des L-HDAg kann isoprenyliert werden, was die Konformation und die Zugänglichkeit zu Antikörper-bindenden Epitopen beeinflusst [35; 55].

1.4 Fragestellung

Viele Antigene besitzen eine schwache Immunogenität für B-Zellen und induzieren nach Immunisierung nur geringe Antikörperantworten. In der vorliegenden Arbeit sollten $CD4^+$ T-Zell-vermittelte Helfer-Signale charakterisiert werden, die die Induktion von Antikörpern gegen schwach immunogene Antigene verbessern.

i) Als Modellantigen sollte das Hepatitis D δ-Antigen (HDAg) charakterisiert werden, da es trotz seiner Größe von 200 Aminosäuren nur eine sehr schwache Immunogenität für B-Zellen aufweist.

ii) Zur Steigerung der Immunogenität von rekombinantem HDAg sollten ko-applizierte konventionelle Adjuvantien (z.B. immunstimulierende CpG-haltige Oligodesoxynukleotide) als auch immunstimulierende Proteine (z.B. HBcAg) verwendet werden.

iii) Zudem sollten die HDAg-spezifischen Immunantworten nach DNA-basierten Immunisierungen analysiert werden.

iv) Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellte die Identifizierung von Antikörper-bindenden Domänen auf dem HDAg dar.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Biochemikalien

Eine Liste der verwendeten Chemikalien und Biochemikalien befindet sich im Anhang.

2.2 Mausstämme

Für die Immunisierungsversuche wurden C57BL/6J (B6) Mäuse (H-2^b) und BALB/cJ Mäuse (H-2^d) als Standard-Mausstämme verwendet. Ferner wurden MHC-Klasse-II defiziente (A$\alpha^{-/-}$ KO) B6-Mäuse [46] und B6-Mäuse, die GFP von einem Transgen unter der Kontrolle eines ß-Aktin Promotors exprimieren [41; 70], eingesetzt. Alle Mausstämme wurden unter standardisierten keimfreien Bedingungen in der Tierzuchtanlage der Universität Ulm gezüchtet und gehalten. Die weiblichen Mäuse wurden im Alter von 12 bis 16 Wochen für die Experimente eingesetzt.

2.3 Immunisierungsvektoren

Plasmid-DNA zur Immunisierung und transienten Transfektion wurde unter Verwendung des pEGFP-N1 (Kat-Nr.:6085-1; Clontech, Heidelberg) Vektors konstruiert. Bei diesem Vektor wird GFP unter der Kontrolle eines humanen Cytomegalie-Virus-*immediate-early*-Promotors (hCMV) exprimiert. Freundlicherweise wurde uns das Plasmid pDL445, das das gesamte Hepatitis D Virus-Genom vom Genotyp I enthält, von Dr. J.L. Casey (Department of Microbiology; Rockville, USA) zur Verfügung gestellt [13].

<u>pCMV/S-HDAg:</u>

Dieses Plasmid wurde uns freundlicherweise von Dr. Michael Geissler, Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt [61]. Es exprimiert S-HDAg unter der Kontrolle eines hCMV-Promotors.

pCMV/L-HDAg:

Zunächst wurde die cDNA des L-HDAg aus dem Plasmid pDL445 mittels PCR und den Primern HDV 02+ und HDV 02- amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt und der Vektor pEGFP/N1 mit NheI und BamHI geschnitten. Das klonierte Plasmid exprimiert ausschließlich L-HDAg, da der Primer HDV 02- ein Stop-Kodon enthält. Die Korrektheit des Plasmids wurde mittels Sequenzierung überprüft.

pCMV/L-HDAg-GFP:

Die Klonierung des Plasmids pCMV/L-HDAg-GFP erfolgte analog zu pCMV/L-HDAg unter Verwendung der Primer HDV 01+ und HDV 01-. Da der Primer HDV 01- im Gegensatz zu HDV 02- kein Stop-Kodon enthält und das Einfügen des Inserts im gleichen Leseraster zum GFP erfolgte, exprimiert das Plasmid pCMV/L-HDAg-GFP sowohl L-HDAg als auch das green fluorescent protein (GFP) als Fusionsprotein. Die Korrektheit des Plasmids wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Immunisierungsvektoren, die für HSP73-assoziierte chimäre Proteine kodieren:

Für die Konstruktion HSP73-assozierter Immunisierungsvektoren wurde der Vektor pE1/cT272-Ek-His herangezogen. Dieser wurde in unserer Arbeitsgruppe aus pEGFP-N1 (Kat-Nr.:6085-1; Clontech, Heidelberg) konstruiert und enthält im Wesentlichen statt des GFP die DnaJ-Domäne des SV40-T-Antigens [90]. Die Fragmente oder die gesamte cDNA des Hepatitis D δ-Antigens wurden in fortlaufendem Leserahmen folgendermaßen in den Expressionsvektor pE1/cT272-Ek-His hinter die HSP73-bindende DnaJ-Domäne des SV40 T-Antigens kloniert [90]:

pCMV/cT272-L-HDAg:

Zunächst wurde die cDNA des L-HDAg aus dem Plasmid pD445 mittels PCR unter Verwendung der Primer HDV 01+ und HDV-02- amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt und der Vektor pE1/cT272-Ek-His mit HindIII und BamHI geschnitten und ligiert. Das von diesem Plasmid exprimierte chimäre Protein cT272-L-HDAg enthält N-terminal die

HSP73-bindende Domäne und C-terminal das komplette L-HDAg mit 214 Aminosäuren.

pCMV/cT272-L1-HDAg:

Die Klonierung erfolgte analog zu pCMV/cT272-L-HDAg mit den Primern HDV 01+ und HDV-frag 01-.

pCMV/cT272-L2-HDAg:

Die Klonierung erfolgte analog zu pCMV/cT272-L1-HDAg mit den Primern HDV-frag 2+ und HDV-frag 02-.

pCMV/cT272-L3-HDAg:

Die Klonierung erfolgte analog zu pCMV/cT272-L1-HDAg mit den Primern HDV-frag 03+ und HDV 02-.

Die verwendeten Primer (MWG Biotech, Ebersberg) haben folgende Sequenzen (Stop-Kodons sind unterstrichen):

Tab. 1: Primersequenzen

Primer	**Sequenz**
HDV 01+:	5´-AAAAAGCTTATGAGCCGGTCCGAGTCGAGG-3´
HDV 01-:	3´-AAAGGATCCCACTGGGGTCGACAACTCTGGG-5´
HDV 02+:	5´-AAAGCTAGCATGAGCCGGTCCGAGTCGAGG-3´
HDV 02-:	3´-AAAGGATCCTCACTGGGGTCGACAACTCTGG-5´
HDV-frag 01-:	3´-AAGGATCCTAGGAGTCTACCTCCATCTGGTCCGTTC-5´
HDV-frag 02+:	5´-AAAAAGCTTGCCCGAACGGACCAGATGGAG-3´
HDV-frag 02-:	3´-AAAGGATCCTCATCCACCTTCGAGGGGGTTCACAC-5´
HDV-frag 03+:	5´-AAAAAGCTTAGAAGAGTAGCCGGCCCGCC-3´

Alle Restriktionsenzyme, Ligase, Klenow-Polymerase und die benötigten Puffer wurden von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Die PCR-Reaktion wurde unter Verwendung des Pfu-Polymerase Kits (Quiagen, Hilden) durchgeführt. Die Aufreinigung der verwendeten Plasmid-DNA erfolgte mittels Quiagen Mega Prep Kit (Kat-Nr.: 10081; Hilden) und Quiagen Maxi Prep Kit (Kat-Nr.: 10080; Hilden). Die Lagerung der in dH_2O resuspendierten Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur

2.4.1.1 Verwendete Zelllinien

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK wurde uns freundlicherweise von Dr. J. Kuhse (Ulm) zur Verfügung gestellt. Die DBA/2 H-2^d- Mastozytomzelllinie P815 (TIB-64) wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) bezogen. Die P815/L-HDAg-Zelllinie stellte uns freundlicherweise Dr. M. Geissler (Freiburg) zur Verfügung [61].

2.4.1.2 Reagenzien und Medien

- Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline* - PBS):
  in pulverisierter Form für 10 l (Kat-Nr.: L-182-10; Biochrom, Berlin)
- Fötales Kälberserum (FCS):
  (Kat-Nr.: A15-649; PAA Laboratories, Linz, Österreich)
- PBS/FCS:
  1 % FCS in PBS
- Beta-Mercaptoethanol (β-ME):
  (Kat-Nr.: M-7522; Sigma, Deisenhofen) 14.3 M β-ME wurde 14.3fach in dH_2O verdünnt und je 2 ml wurden bei –20 °C gelagert. Diese Stocklösung wurde dann bei Gebrauch 1:10 mit PBS verdünnt, um eine 0.1 M β-ME-Lösung zu erhalten, und sterilfiltriert.
- HEPES:
  1 M Lösung (Kat-Nr.: L-1613; Biochrom, Berlin)
- L-Glutamin:
  100 x Lösung (Kat-Nr.: M11-004; PAA Laboratories, Linz, Österreich)
- Penicillin-Streptomycin:
  100 x Lösung (Kat-Nr.: P11-010; PAA Laboratories, Linz, Österreich)

- Click's RPMI 1640 (RPMI):

  in pulverisierter Form für 10 l (Kat-Nr.: A2044.9050; Applichem, Darmstadt); für einen 10 l Ansatz müssen 11.75 g $NaHCO_3$ und 23.83 g HEPES (Kat-Nr.: 25245; Serva, Heidelberg) zugegeben werden;

- RPMI / 5 % FCS:

Tab. 2: RPMI-Medium

RPMI	**1000 ml**
FCS (*fetal calf serum)*	50 ml
L-Glutamin (100 x)	10 ml
Penicillin-Streptomycin (100 x)	10 ml
β-ME	1 ml

- Minimal essential Medium - alpha (αMEM):

  (Kat-Nr.: 22561-021; GibcoBRL, Eggenstein)

- αMEM / 10 % FCS:

Tab. 3: αMEM-Medium

αMEM	**500 ml**
FCS (*fetal calf serum)*	50 ml
L-Glutamin (100 x)	5 ml
Penicillin-Streptomycin (100 x)	5 ml
β-ME	0.5 ml
HEPES (1 M)	5 ml

- Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM):

  (Kat-Nr.: 31885-023; GibcoBRL, Eggenstein)

- DMEM / 10% FCS:

Tab. 4: DMEM-Medium

DMEM	**500 ml**
FCS (*fetal calf serum)*	50 ml
L-Glutamin (100 x)	5 ml
Penicillin-Streptomycin (100 x)	5 ml

- RPMI 1640 ohne L-Methionin / ohne L-Glutamin:
  (Kat-Nr.: F 1245; Biochrom, Berlin)
- UltraCulture Medium:
  (Kat-Nr.: 12-725F; BioWhittaker, Verviers, Belgien)
- Geneticin® (G-418-Sulfat):
  (Kat-Nr.: 066-1811; GibcoBRL, Eggenstein); 10 g wurden in 55 ml PBS gelöst, sterilfiltriert und portioniert bei –20 °C gelagert.
- Plastikware:
  wurde von Nunc (Wiesbaden) bezogen

2.4.1.3 Kultivierung der Zelllinien

Die Zellen wurden in Gewebekulturschalen oder –flaschen in Click´s RPMI/ 5 % FCS bei 37 °C und 5 % CO_2 gehalten, wobei die Zellen alle drei bis vier Tage gesplittet und mit neuem Medium versehen wurden.

2.4.2 Transfektion eukaryontischer Zellen

Aufgrund der Eigenschaft von Säugerzellen, Calciumphosphatkristalle zu phagozytieren, kann durch diese Methode mit Calciumphosphatkristallen kopräzipitierte Plasmid-DNA in Säugerzellen eingebracht werden.

Transfektion von HEK293-Zellen:
Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so auf Zellkulturschalen (8 cm Durchmesser) ausgesät und über Nacht inkubiert, dass am Transfektionstag die Schalen 50-70 % bewachsen waren. Etwa 30 min vor der Transfektion wurde das Medium (10 ml DMEM/ 10 % FCS) gewechselt. Ein Transfektionsansatz von 500 µl setzte sich aus 10 µg DNA, 62 µl $CaCl_2$ und dH_2O zusammen. Diese Mischung wurde unter leichtem Schütteln (Vortexen) zu 500 µl 2×HBS hinzugegeben, 90 sek bei RT inkubiert und dann vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach zwölfstündiger Inkubation wurden die Zellen mit 10 ml DMEM/ 10 % FCS gewaschen.

Tab. 5: 2×HBS

2×HBS	**500ml**
NaCl (280 mM)	8.2 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1,5 mM)	0.13 g
HEPES	5.95 ml
dH_20	ad 500 ml
pH	7.13

Nach 48-72 h wurden die Zellen entweder mittels Immunpräzipitation oder mittels Western Blot auf Expression getestet.

2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Verwendete Antikörper

Die folgenden Antikörper (Ak) wurden für den spezifischen Antigennachweis in der Immunpräzipitation und im Western Blot verwendet:

Tab. 6: Antikörper

Antikörper	**Kat-Nr./Herkunft**
Monoklonaler anti SV40-T-Ag Ak (PAb 108)	Zur Verfügung gestellt von Dr. W. Deppert, Heinrich-Pette Institut, Hamburg
Polyklonaler Kanichen anti-HDAg-Ak	Zur Verfügung gestellt von Dr. Geissler, Universität Freiburg, Freiburg
Kaninchen-anti-Maus IgG	Kat-Nr.: M-6024; Sigma, Deisenhofen

2.5.2 Immunpräzipitation

Eukaryontische Zellen, die nach Transfektion auf Antigen-Expression getestet werden sollten, wurden mit PBS gewaschen, in 2 ml methioninfreiem RPMI 1640 mit 5 % dialysiertem FCS aufgenommen und anschließend auf einer Petrischale (ca. 8 cm Durchmesser) ausgesät. Darauf wurden die Zellen über

Nacht mit 100 µCi [^{35}S]-Methionin (Kat-Nr.: AG 1094; Amersham, Freiburg) bei 5 % CO_2 und 37 °C inkubiert. Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden mit 1 ml Lysepuffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5 % NP 40, 1% Trasylol, 1 µg / ml Leupeptin) 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde der proteinhaltige Zellextrakt durch 30minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C geklärt. Dieser geklärte Überstand wurde dann mit Antikörpern in einer vorher austitrierten Konzentration versetzt. Nach einstündiger Inkubation auf Eis unter Schütteln wurden 200 µl Protein-A-Sepharose™ CL-4B (PAS) (Kat-Nr.: 17-0963-03; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) hinzugegeben und wierderum 1 h auf Eis unter Schütteln inkubiert. In einem anschließenden Zentrifugationsschritt (15 sek bei 14000 rpm) konnten die Antigen-Antikörper-PAS-Komplexe abzentrifugiert werden. Diese wurden dann fünfmal mit Waschpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM LiCl, 0.5% NP 40), zweimal mit PBS und zweimal mit 0.1x PBS gewaschen. Durch Zugabe von 300 µl Elutionspuffer (5 mM Tris/HCl pH 6.8, 2 % SDS, 5 % β-ME) und Inkubation bei 37 °C unter starkem Schütteln wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe von der PAS getrennt (Elution). Nach dem Abzentrifugieren der PAS wurden 300 µl Überstand entnommen, 15 min bei –80 °C gelagert und anschließend lyophilisiert.

2.5.3 SDS-Page

Die lyophilisierten Proben aus der Immunpräzipitation wurden in 30 µl Proteinprobenpuffer (Gemisch aus Bromphenolblau in Glycerin, 5 % β-ME, dH_2O) aufgenommen und 3 min bei 95 °C aufgekocht. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wurden 8 µl des [^{14}C] markierten Standards (Kat-Nr.: CFA 756; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 22 µl des Proteinprobenpuffers zu lyophilisiertem Elutionspuffer gegeben und ebenfalls 3 min bei 95 °C aufgekocht. Zur elektrophoretischen Trennung wurden 7.5 - 15 %ige Mini-SDS-Polyacrylamid-Gele mit je 10 µl der Proben geladen. Zur Darstellung der Proteinbanden wurden die Gele 10 min in Coomassie-Blau (1.2 g Coomassie-Blau, 448 ml Methanol, 92 ml Essigsäure, ad 1000 ml dH_2O)

gefärbt und daraufhin 10 min entfärbt (10 % Isopropanol, 10 % Methanol, in dH_2O). Die 10 min in Essigsäure entwässerten Gele wurden zur Verstärkung des radioaktiven Signals 10 min in Essigsäure mit 10 % PPO inkubiert, 15 min gewässert, auf Filterpapier gebracht und 1 h bei 80 °C im Vakuum getrocknet. Je nach Signalintensität wurden die Gele einen bis mehrere Tage bei -80 °C mit aufgelegtem Röntgenfilm (BioMax MR, Kat-Nr.: 8701302; Kodak, Cedex, Frankreich) gelagert. Anschließend wurden die Filme entwickelt.

2.5.4 Western Blot

Spezifisch aus dem Lysat nicht [^{35}S]-markierter transfizierter Zellen immunpräzipitierte oder anderweitig aufgereinigte Proteine wurden mittels SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt. Nach 10minütiger Äquilibration (20 mM Tris/Acetat pH 8.3, 0.1 % SDS) wurden die auf den Gelen aufgetrennten Proteine in einem Transferpuffer (20 mM Tris/Acetat pH 8.3, 0.1 % SDS, 20 % (v/v) Isopropanol) durch Elektroblotting (Mini Trans-Blot® Cell, Kat-Nr.: 170-3930; Biorad, Hercules, California, USA) 1 h bei 60 V auf eine Nitrozellulosemembran (Protran®, Kat-Nr.: 10401196; Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert. Um eine Fixierung der Proteine auf der Membran zu erreichen, wurde diese nach dem Transfer 30 min in 50 % Isopropanol inkubiert, 20 min gewässert und 15 min in TBS (15 mM Tris/HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 5 mM NaN_3, 1 mM EDTA) geschwenkt. Um später weitere unspezifische Bindungen von Proteinen zu verhindern, wurde der Blot über Nacht in TBS / 0.1 % Gelatine mit 100 µg/ml IgG-freiem BSA abgesättigt. Anschließend wurde dieser dreimal jeweils 15 min mit Puffer GT (TBS, 0.1 % Gelatine, 0.1 % Tween 20) gewaschen und mit den Primärantikörpern (1:500 bis 1:1000 in Puffer GT) oder dem zu testenden Mausserum (1:50 bis 1:250) 3 h inkubiert. Entstammte das Serum oder der Primärantikörper der Maus, so wurde der Blot ca. 1.5 h mit einem Sekundärantikörper (Kaninchen anti-Maus IgG 1:500 in Puffer GT) inkubiert, da das anschließend verwendete Protein A v.a. an den Fc-Teil von Kaninchen- oder Human-IgG bindet. Nach dreimaligem Waschen der Membran je 10 min mit Puffer GT wurde der Blot mit 0.1 µCi

[^{35}S]-SLR Protein A (Kat-Nr.: SJ.444, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) pro ml Puffer GT über Nacht inkubiert. Freies Protein A wurde durch fünfmaliges Waschen mit Puffer GT entfernt. Der luftgetrocknete Blot wurde zur Signalverstärkung kurz in Toluol mit 20 % PPO geschwenkt. Je nach Signalintensität wurde der Blot einen bis mehrere Tage bei -80 °C mit aufgelegtem Röntgenfilm (BioMax MR, Kat-Nr.: 8701302; Kodak, Cedex, Frankreich) gelagert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

2.5.5 Bestimmung der HDAg- und HBsAg-spezifischen Antikörper

Die Blutproben wurden den Mäusen jeweils nach den angegebenen Zeitpunkten durch Anritzen der Schwanzvene entnommen. Anschließend wurde das Blut 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach weiterer Inkubation bei 4 °C wurden die Proben 20 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das somit gewonnene Serum bei -20 °C gelagert.

2.5.5.1 Antikörper-Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur Bestimmung des Antikörpergesamttiters und des Isotyptiters wurden MicroELISA-Platten (Nunc-Maxisorp, Nunc, Wiesbaden) mit 100 ng rekombinantem Antigen (p24 oder HBsAg) pro Vertiefung in 50 µl Coating-buffer (0.2 M $NaCO_3$, 0.2 M $NaHCO_2$, pH 9.5) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS/ 0.05 % Tween 20) freie Proteinbindungsstellen mit 200 µl Blockingpuffer (PBS/ 0,3 % BSA) 30 min bei RT abgesättigt, um spätere Bindungen von unspezifischen Serum-Antikörpern zu verhindern. Nach erneutem fünfmaligen Waschen wurden 50 µl des zu testenden Serums, verdünnt im Blockingpuffer (als Verdünnungsreihe), 2 h bei RT inkubiert. Wiederum wurden die Platten fünfmal gewaschen und anschließend 50 µl des Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Isotyp-Ak (anti-Maus-IgG, Kat-Nr.: 12067E; anti-Maus-IgG1, Kat-Nr.: 02237E; anti-Maus-IgG2a, Kat-Nr.: 02017E; Pharmingen, Hamburg- 1:2000 verdünnt in PBS/ 3 % BSA; anti-Maus-IgG2b, Kat-Nr.: 3196; Rockland, Li, USA - 1:3000

verdünnt in PBS / 3 % BSA) zu den Platten gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl Substratlösung (O-Phenylendiamin x 2 HCl; Kat-Nr.: 6172-24; Abbott, Wiesbaden) hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 15 min bei RT in Dunkelheit wurde die Reaktion mit 1 M H_2SO_4 gestoppt und die Extinktion bei 492 nm und 620 nm gemessen. Als Endpunkt-Titer wurde die höchste Verdünnung definiert, die eine dreifach höhere Absorption aufwies als die von negativen Kontrollseren.

2.5.5.2 Antikörperbestimmung im Western Blot Verfahren

Die Serumproben wurden mittels Western Blot auf HDAg-spezifische Antikörper getestet (siehe 2.5.4 Western Blot). Dabei wurden 0.5 µg rekombinantes S-HDAg (p24) (Kat-Nr.: BIN 039; Acris GmbH, Hiddenhausen) als Detektionsantigen eingesetzt. Die Seren wurden in verschiedenen Verdünnungen als Primärantikörper eingesetzt.

2.6 Zytotoxische T-Lymphozyten

Zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) lassen sich auf unterschiedliche Weise nachweisen. Die Funktionalität und Aktivität der ZTL kann mit einem Chromfreisetzungstest untersucht werden. Eine sensitivere Methode, die allerdings keine Aussage über die Zytotoxizität der $CD8^+$ T-Lymphozyten erlaubt, stellt die Detektion der Antigen-spezifischen ZTL-Vorläufer mittels Zytofluorometrie auf Zytokinproduktion dar.

2.6.1 Isolierung und *in vitro* Restimulation von Milzzellen

Die Mäuse wurden elf Tage nach der zweiten Immunisierung mit CO_2 getötet, die Milzen steril entnommen und daraufhin in 10 ml PBS/ 1 % FCS überführt. Die Milzen wurden anschließend durch ein Stahlgitter gedrückt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Erythrozyten wurden lysiert (0.14 M NaH_4Cl, 0.17 M Tris/HCl pH 7.2), die Milzzellen zweimal mit PBS / 1 % FCS

gewaschen und 3 x 10^7 Zellen in 25 cm^2-Zellkulturflaschen mit 10 ml α-MEM / 10 % FCS / 2 % Rattenfaktor überführt. Für die Stimulation HDAg-spezifischer ZTL-Vorläufer wurden 1×10^6 mit 20000 rad bestrahlte syngene P815/L-HDAg Zellen, dem Ansatz hinzugegeben. Die Flaschen wurden aufrecht-stehend 5 Tage bei 37 °C/ 5 % CO_2 inkubiert.

2.6.2 Zytotoxizitätstest (Chromfreisetzungstest)

Die Zytotoxizität der Milzzellen von immunisierten Mäusen wurde nach fünf Tagen Stimulation untersucht. Die Zielzellen wurden mit 250 µCi [^{51}Cr] (Natriumchromat, Kat-Nr.:CJS 4; Amersham, Freiburg) 90 min bei 37 °C inkubiert und anschließend zweimal mit α-MEM / 10 % FCS gewaschen. Eine Verdünnungsreihe der Effektorzellen (log2) wurde mit 2×10^3/well [^{51}Cr]-markierten Zielzellen in 200 µl Rundbodenplatten kultiviert. Als Kontrolle wurden zusätzlich markierte Zielzellen ohne T-Zellen inkubiert. Nach 3.5 h wurden 50 µl des Kulturüberstandes in 96-Well Platten (Kat-Nr.: 1450-401; Wallac, Turku, Finnland) überführt, zur Verstärkung des Signals 150 µl Szintillationsflüssigkeit (Kat-Nr.: 1200-439; Wallac, Turku, Finnland) zugegeben und die freigesetzte Radioaktivität mittels eines „1450 MicroBeta Trilux liquid scintillation and luminescence γ-Counters“ (Wallac, Turku, Finnland) bestimmt.

2.6.3 Nachweis Antigen-spezifischer IFN-γ produzierender $CD8^+$ T Zellen

In eine Vertiefung einer 96-well Rundbodenplatte wurden 1.5×10^6 Milzzellen (in 100 µl RPMI/ 5 % FCS) überführt. Pro Vertiefung wurde mit 1.5×10^5 syngenen P815 Zellen stimuliert. Um eine INF-γ Sekretion stimulierter $CD8^+$ T Zellen zu inhibieren, wurde Brefeldin A (Kat-Nr.: 350-019-M025; Alexis, Grünberg) zu den Wells in der Menge hinzugegeben, so dass 5 µg/ml Endkonzentration erreicht wurde. Nach einer 4stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abzentrifugiert und die sechs identischen Vertiefungen nach Aufnahme in Puffer A (PBS, 0.5 % (w/v) BSA, 0.1 %(w/v) NaN_3) in einem Well vereinigt. Um später eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern, wurden die Fc-

Rezeptoren durch Zugabe von 1 µg anti-CD 16/32 mAk 2.4G2 für 15 min bei 4 °C blockiert. Nach dem Waschen der Zellen mit Puffer A wurden CD8-Oberflächenantigene mit PE (R-Phycoerythrin)-konjugiertem anti-CD8 mAk (1:200 Verdünnung in Puffer A; Kat-Nr.: 01045B; Pharmingen, Hamburg) für 20 min bei 4 °C spezifisch gefärbt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Puffer A gewaschen, dann mit 2 % Paraformaldehyd in Puffer A für 20 min bei RT fixiert und anschließend mit Puffer B (PBS, 0.5 % (w/v) BSA, 0.5 % (w/v) Saponin, 0.05 % (w/v) NaN_3) bei RT 15 min permeabilisiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit FITC (Fluoroisothiocyanat)-konjugiertem anti-INF-γ mAk (0.5 µg/ml – 1:400 Verdünnung in Puffer B; Kat-Nr.: 55441; Pharmingen, Hamburg) bei RT 30 min inkubiert. Nachdem die Zellen dreimal unter Verwendung von Puffer B gewaschen worden waren, wurden diese in Puffer A aufgenommen. Die Anzahl der $CD8^+$ IFN-γ^+ T-Lymphozyten wurde mit dem FACScalibur (Becton & Dickinson Biosciences, Heidelberg) zytofluorimetrisch analysiert. Dargestellt ist jeweils die durchschnittliche Anzahl der $CD8^+$ IFN-γ^+ T-Lymphozyten/ 10^5 Milzzellen.

2.6.4 Rattenfaktor

Rattenmilzen wurden steril entnommen und in PBS / Gentamycin (30 µg/ml; Kat-Nr.: 15750-037; GibcoBRL, Eggenstein) überführt. Die Isolierung der Milzzellen erfolgte mittels eines Stahlgitters. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS (Gentamycin) gewaschen, in RPMI/ 3 % FCS/ 3 µg/ml Concanavalin A (Kat-Nr.: C-0412; Sigma, Deisenhofen) aufgenommen und 5×10^6 Zellen/ ml in einem Volumen von 150 ml (in 600 ml Zellkulturflaschen) aufrecht stehend bei 37 °C 24 h kultiviert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

2.7 Oligodesoxynukleotide

Damit die einzelsträngigen Oligodesoxynukleotide (ODN) gegenüber Nukleasen resistent sind, wurden sie mit einem Nuklease-resistenten Phosphorthioat-Rückgrat (PTO modifiziert) versehen. Die folgenden ODN der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) kamen zur Verwendung:

ODN1826: 5´TCCATGACGTTCCTGACGTT 3´
Diese ODN enthalten immunstimulatorische CpG-Sequenzen (unterstrichen), 5´ flankiert von zwei Purinen und 3´ von zwei Pyrimidinen

ODN1982: 5´TCCAGGACTTCTCTCAGGTT 3´
Bei diesen ODN wurden die immunstimulatorische CpG-Sequenz gegen eine GpG-Sequenz ausgetauscht. Somit haben diese ODN keine immunstimulatorische Wirkung.
Die lyophilisierten ODN wurden in einer Konzentration von 10mg/ ml in dH_20 gelöst.

2.8 Immunisierungen

Die Mäuse wurden zuerst mit dem Inhalationsnarkotikum Forene® (Isufluran, Kat-Nr.: 015-038-601; Abbott Wiesbaden) anästhesiert. Nach anschließender Rasur der Hinterbeine wurden insgesamt 5 µg Protein oder 100 µg Plasmid DNA, gelöst in 100 µl 1×PBS, in die beiden *Tibialis anterior* Muskeln injiziert.

2.9 Statistische Verfahren

Die Daten wurden mittels der Statistik-Software PRISM (Version 3.0, GraphPad, San Diego, United States of America) analysiert. Um die Antikörper- und T-Zell-Antworten der aus jeweils drei bis fünf Mäusen bestehenden Gruppen vergleichen zu können, sind die Werte als Mittelwert ± SD (Standardabweichung) dargestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Induktion von Hepatitis D Virus-spezifischen Immunantworten durch rekombinantes p24 S-HDAg Protein

Für die Immunisierung mit rekombinanten HDV-Proteinen wurde Hefe-exprimiertes p24 S-HDAg verwendet. Die Reinheit des rekombinanten p24 Proteins wurde durch SDS-Gelelektrophorese und Coomassie Blau Färbung der Gele analysiert (Abb. 6).

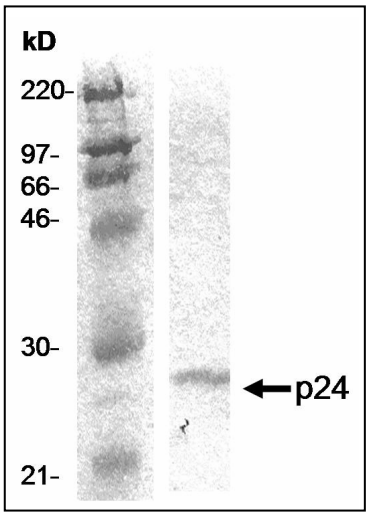

Abb. 6: Rekombinantes Hepatitis D p24 Antigen.
Hefe-exprimiertes Hepatitis D p24 Antigen wurde mit SDS Page analysiert. Mit Coomassie Blau Färbung ließ sich die erwartete Proteinbande nachweisen. Das Protein ist mit einem Pfeil markiert.

Balb/c-Mäuse wurden einmalig mit p24 S-HDAg ohne weitere Zugabe von Adjuvantien immunisiert. Die Injektion erfolgte in die *Tibialis anterior* Muskeln. Nach vier Wochen erfolgte die Entnahme von Serumproben und die Bestimmung der HDAg-spezifischen IgG-Antikörpertiter im ELISA-Test. Die immunisierten Mäuse bildeten keine HDAg-spezifische Antikörperantwort aus (Abb. 7A). HDAg-spezifische Antikörper waren auch im Western Blot (Abb. 7B) nicht nachweisbar.

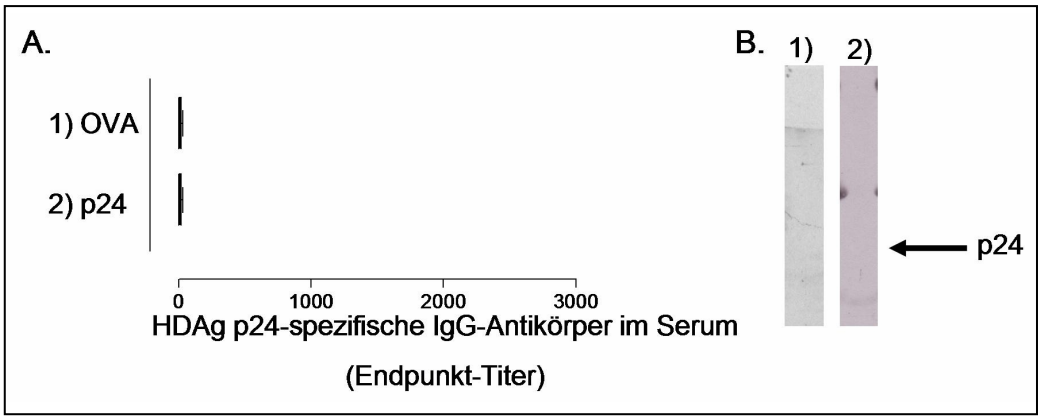

Abb. 7: Immunogenität von rekombinantem Hepatitis D p24 Antigen.
Balb/c-Mäuse wurden i.m. mit 5 µg p24 S-HDAg und als Kontrolle mit 5 µg OVA immunisiert. Nach vier Wochen wurden Serumproben aus dem Schwanzblut der Mäuse gewonnen.
A) Mittels ELISA wurden die HDAg p24-spezifischen Antikörper bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD der Ak-Titer von drei Mäusen.
B) Zudem wurden die Seren mittels Western Blot auf HDAg p24-spezifische Antikörper untersucht (1:25 Verdünnung). Es konnten keine HDAg p24-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Der Pfeil zeigt auf den Bereich, an dem eine Bande bei vorhandenen HDAg p24-spezifischen Antikörpern zu erwarten wäre.

3.1.1 Ko-Applikation von p24 S-HDAg mit immunstimulierenden, CpG-haltigen Oligodesoxynukleotiden (ODN-Hilfe)

Immunstimulierende Oligodesoxynukleotide (ODN), die spezifische CpG Motive enthalten, stimulieren die Immunantworten von rekombinanten Antigenen (Übersichtsartikel: Krieg [36]). Um die Immunantwort gegen das p24 S-HDAg Protein zu steigern, wurden 5 µg p24 S-HDAg mit 30 µg immunstimulatorischen ODN1826 (5´TCCATGACGTTCCTGACGTT3´) oder mit 30 µg nicht-immunstimulatorischen Kontroll-ODN1982 (5´TCCAGGACTTCTCTCAGGT3´) gemischt und in Balb/c-Mäuse injiziert. Vier Wochen nach der ersten Immunisierung wurden die Mäuse mit den gleichen Ansätzen ein zweites Mal immunisiert. In den Serumproben konnten wiederum keine Antikörper gegen das p24 Antigen detektiert werden (Abb. 8A, B).

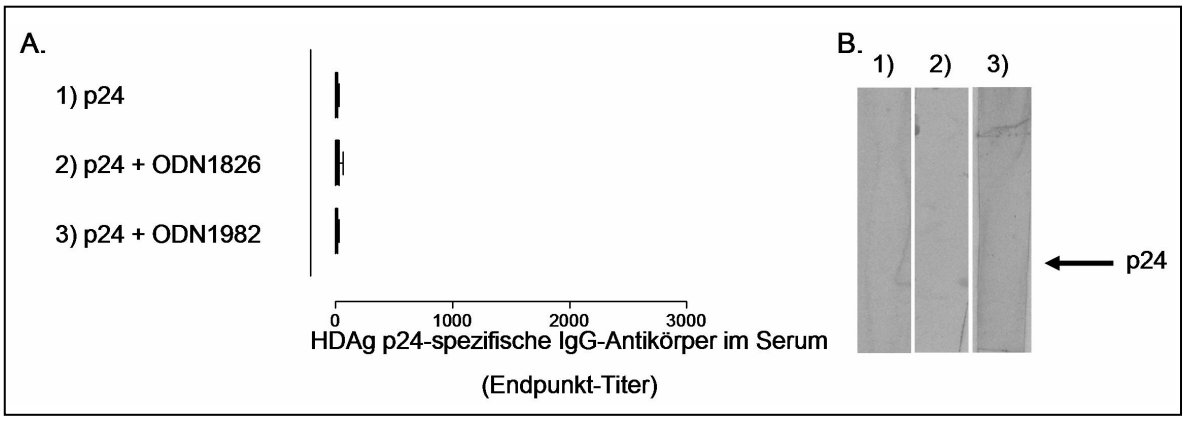

Abb. 8: Die schwache Immunogenität des Hepatitis D p24 Antigens wird durch immunstimulierende Oligodesoxynukleotide (ODN) nicht verbessert.
Balb/c-Mäuse wurden zweimal im Abstand von vier Wochen mit (1) 5 µg p24, (2) 5 µg p24 in Kombination mit 30 µg immunstimulierenden ODN1826 und mit (3) 5 µg p24 in Kombination mit Kontroll-ODN1982 i.m. immunisiert. Nach vier Wochen erfolgte eine zweite Immunisierung der Tiere mit den gleichen Dosen.
A) Nach weiteren vier Wochen wurden die HDAg p24-spezifischen Antikörper im ELISA bestimmt. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SD der Ak-Titer von 3 Mäusen pro Gruppe.
B) Zudem wurden die Seren (1:25 Verdünnung) mittels Western Blot auf HDAg p24-spezifische Antikörper untersucht. Es konnten keine HDAg p24-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Der Pfeil zeigt auf den Bereich, an dem eine Bande bei vorhandenen HDAg p24-spezifischen Antikörpern zu erwarten wäre.

Mit dem immunstimulierenden Oligodesoxynukleotid 1826 konnte die humorale Immunantwort gegen das Hepatitis D Virus p24 Antigen nicht gesteigert werden. Um auszuschließen, dass dieses Ergebnis auf fehlerhaften Immunisierungen oder einem Herstellungsfehler der ODN beruhte, wurde das Experiment mit

rekombinantem Hepatitis B Virus Hüllprotein (HBsAg) anstelle von p24 S-HDAg wiederholt (Abb. 9). In diesem Versuch führte die Mischung von HBsAg mit immunstimulatorischen ODN1826 zu einer signifikanten Erhöhung der HBsAg-spezifischen IgG-Antikörpertiter (Abb. 9A). Die Ko-Applikation von HBsAg mit den Kontroll-ODN1982 führte hingegen zu keiner Erhöhung der HBsAg-spezifischen IgG-Antikörpertiter (Abb. 9A). Die immunstimulierenden ODN1826 führten zu einer präferentiellen Induktion von IgG2a-Subtyp-Antikörpern (Abb. 9B). In HBsAg/ODN1826 immunisierten Mäusen konnte im Vergleich zu den HBsAg oder HBsAg/ODN1982 immunisierten Mäusen eine deutliche Änderung der IgG1/IgG2a-Verhältnisse festgestellt werden (Abb. 9B und 9C). Diese Polarisationsänderung der HBsAg-spezifischen Immunantwort in Richtung Th1 durch immunstimulatorische ODN1826 war beschrieben [21]. Somit zeigten die durchgeführten Kontrollversuche, dass die fehlende Stimulation von ODN1826 auf p24-spezifische Immunantworten auf Eigenschaften des Proteins p24 S-HDAg selbst zurückzuführen war.

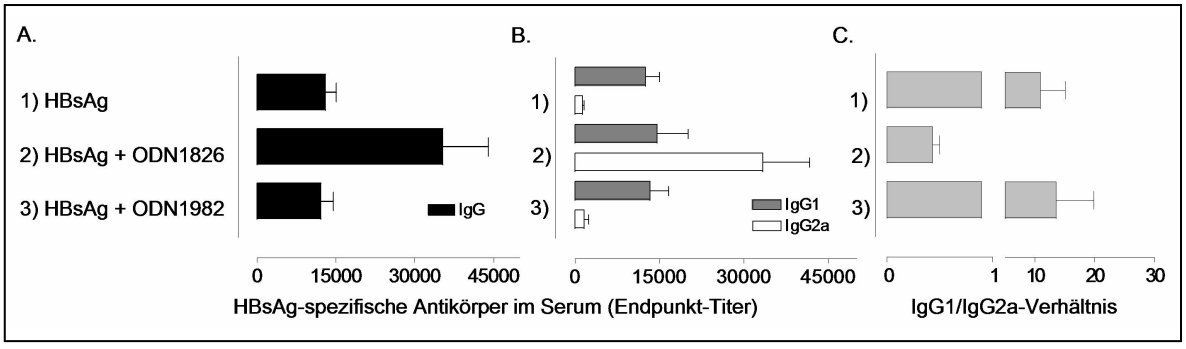

Abb. 9: Kontrollversuch mit Oligodesoxynukleotiden anhand von HBsAg.
Balb/c-Mäuse wurden im Abstand von vier Wochen zweimal mit (1) 5 µg HBsAg, (2) 5 µg HBsAg in Kombination mit 30 µg immunstimulierenden ODN1826 und mit (3) 5 µg HBsAg in Kombination mit 30 µg Kontroll-ODN1982 immunisiert. Nach vier Wochen wurden die HBsAg-spezifischen **(A)** Gesamt IgG-, **(B)** IgG1- und IgG2a-Antikörper im Serum der Mäuse mittels Isotyp-ELISA bestimmt. **(C)** Aus den HBsAg-spezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörpertitern wurden die entsprechenden IgG1/IgG2a-Verhältnisse berechnet. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SD der Ak-Titer von 3 Mäusen pro Gruppe.

3.1.2 Ko-Applikation von p24 S-HDAg mit rekombinantem HBsAg (Antigen-Hilfe)

Das Hepatitis D Virus benötigt das Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus (HBsAg), um infektionsfähige Partikel bilden zu können. Beide Varianten des HDAg interagieren mit dem HBsAg [109]. Da bei Patienten mit einer Hepatitis D-Infektion meist deutliche Antikörpertiter gegen HDAg nachgewiesen werden können, stellte sich die Frage, ob mit der Ko-Applikation von HBsAg zu p24 S-HDAg die humorale Immunantwort gegen S-HDAg gesteigert werden kann. Dazu wurden äquivalente Mengen von p24 S-HDAg und HBsAg gemischt und eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 µg des Proteingemisches in Balb/c-Mäuse injiziert. Zum Vergleich wurden Mäuse mit 5 µg p24 S-HDAg oder mit 5 µg HBsAg immunisiert. Nach vier Wochen erfolgte eine Blutentnahme zur Serumgewinnung. Im ELISA-Testverfahren wurden die Proben auf HDAg-spezifische Antikörper untersucht. In den HBsAg/p24 S-HDAg immunisierten Mäusen wurde eine deutliche Antikörperantwort gegen das p24 S-HDAg induziert (Abb. 10A). HBsAg-immunisierte Tiere zeigten keine Kreuzreaktivität gegen das p24 S-HDAg (Abb. 10A). Somit konnte durch die Ko-Applikation von HBsAg mit p24 S-HDAg die humorale Immunantwort gegen HDAg deutlich gesteigert werden.

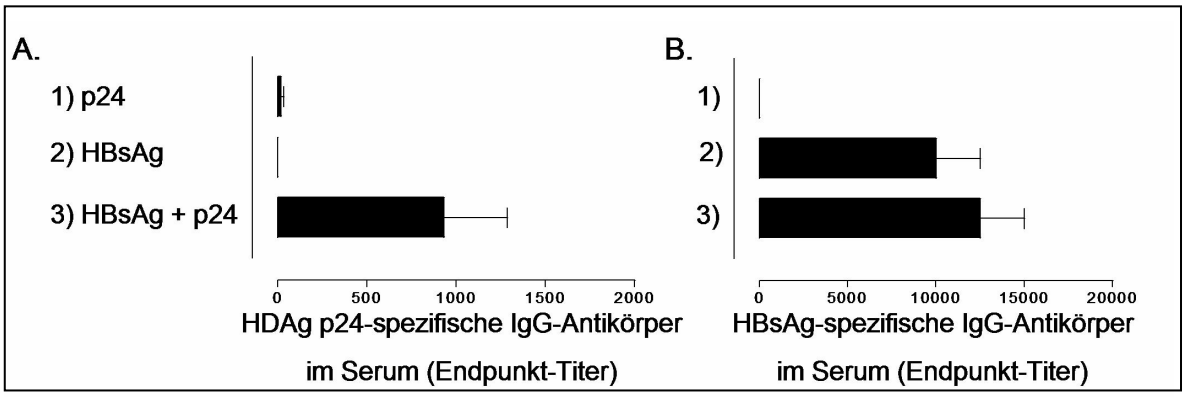

Abb. 10: Steigerung der Immunogenität von Hepatitis D p24 Antigen durch HBsAg.
Äquivalente Mengen von p24 S-HDAg und HBsAg wurden in PBS gemischt und eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert**.** Anschließend wurden Balb/c-Mäuse mit (1) 5 µg p24 (2) 5 µg HBsAg und mit (3) 5 µg aus dem Gemisch HBsAg/p24 S-HDAg immunsiert.
A) Nach vier Wochen wurden die HDAg p24-spezifischen Antikörper im ELISA bestimmt. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SD der Ak-Titer von 3 Mäusen pro Gruppe.
B) Zudem wurden die HBsAg-spezifischen Antikörper im ELISA bestimmt. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SD der Ak-Titer von 3 Mäusen pro Gruppe.

Um die Frage zu klären, ob die Immunantwort gegen HBsAg durch das ko-applizierte p24 S-HDAg ebenfalls beeinflusst wird, wurden die oben beschriebenen Seren zusätzlich auf HBsAg-spezifische Antikörper untersucht. In den HBsAg und HBsAg/p24 S-HDAg immunisierten Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede in den HBsAg-spezifischen Antikörpertitern feststellbar (Abb. 10B).

Durch die Ko-Applikation von HBsAg mit p24 S-HDAg konnte die humorale Immunantwort gegen S-HDAg deutlich gesteigert werden. Um die Spezifität dieser Immunmodulation zu untersuchen, wurden Immunisierungsversuche mit Mischungen aus p24 S-HDAg und HBV Core Antigen oder Ovalbumin durchgeführt (Abb. 11). Auch in diesen Experimenten konnten die p24 S-HDAg-spezifischen Antikörperantworten deutlich gesteigert werden (Abb. 11). Die Induktion von p24 S-HDAg-spezifischen Antikörpern war somit abhängig von ko-applizierten Hilfsproteinen.

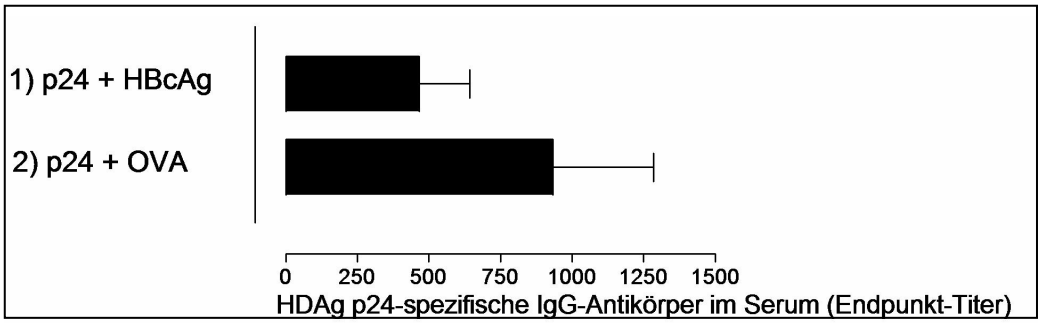

Abb. 11: Steigerung der Immunogenität von Hepatitis D p24 durch unspezifische Proteine.
Balb/c-Mäuse wurden jeweils mit 5 µg aus einer Mischung von (1) HBcAg mit p24 und (2) OVA mit p24 i.m. immunisiert. Nach vier Wochen wurde den Tieren Schwanzblut zur Serumgewinnung abgenommen. Die Seren wurden mittels ELISA auf HDAg p24-spezifische Antikörper untersucht. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SD der Ak-Titer von 3 Mäusen pro Gruppe.

3.2. HDV-spezifische DNA-Immunisierung

Antigen-kodierende DNA-Impfstoffe sind potente Induktoren von $CD8^+$ T-Zellen. Nach DNA-Immunisierung wurden aber auch Antigen-spezifische humorale Immunantworten beschrieben, unabhängig davon, ob sezernierte oder intrazelluläre Proteine exprimiert wurden (Übersichtsartikel: [33]). S-HDAg, L-HDAg und ein Fusionsprotein aus L-HDAg und dem *green fluorescent protein* (L-HDAg-GFP) wurden in hCMV Promotor-regulierte Expressionsvektoren kloniert (Abb. 12A)

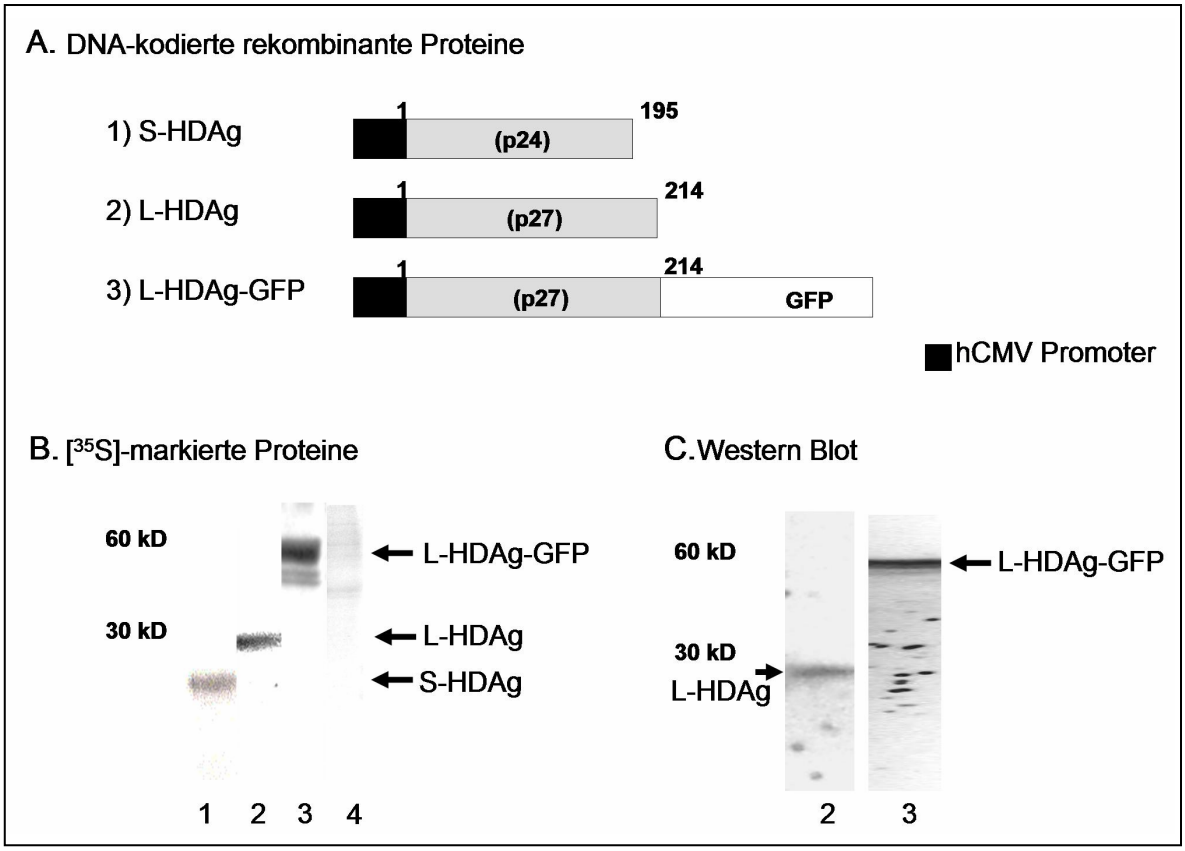

Abb. 12: DNA-kodierte rekombinante HDV-Proteine und deren Expression.
A) DNA-kodierte rekombinante HDV-Proteine. (1) S-HDAg, (2) L-HDAg und (3) ein Fusionsprotein aus L-HDAg und dem GFP (L-HDAg-GFP) wurden in hCMV Promotor-regulierte Expressionsvektoren kloniert.
B) [^{35}S]-markierte Proteine. HEK293-Zellen wurden transient mit (1) pCMV/S-HDAg, (2) pCMV/L-HDAg und (3) pCMV/L-HDAg-GFP transfiziert, [^{35}S]-Methionin markiert, lysiert und die Proteine (1) S-HDAg, (2) L-HDAg und (3) L-HDAg-GFP mit einem HDAg-spezifischen polyklonalen Antiserum immunpräzipitiert. pCMV/L-HDAg-GFP zeigte dabei eine 3 bis 5fach höhere Expression als die anderen beiden Immunsierungsvektoren. (4) Im Überstand von den mit pCMV/L-HDAg transfizierten Zellen war kein L-HDAg nachweisbar.
C) Western Blot. Zudem wurden HEK293-Zellen mit (2) pCMV/L-HDAg und (3) pCMV/L-HDAg-GFP transient transfiziert. Die Lysate der Zellen wurden anschließend im Western Blot analysiert. Auch hier zeigte pCMV/L-HDAg-GFP eine 3 bis 5fach höhere Expression als pCMV/L-HDAg.

HEK293-Zellen wurden mit den Immunisierungsvektoren transient transfiziert, mit [^{35}S]-Methionin markiert, lysiert und mit einem polyklonalen HDAg-spezifischen Antiserum immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE konnten die DNA-kodierten S-HDAg, L-HDAg und L-HDAg-GFP Proteine nachgewiesen werden (Abb. 12B). Im Vergleich zu p24 S-HDAg und p27 L-HDAg war das p54 L-HDAg-GFP-Fusionsprotein 3 bis 5 mal stärker exprimiert (Abb. 12B). Die erhöhte L-HDAg-GFP Expression war auch im Western Blot nachweisbar (Abb. 12C). Im Überstand der mit pCMV/L-HDAg transfizierten Zellen war kein L-HDAg nachweisbar (Abb. 12B). Somit konnte gezeigt werden, dass L-HDAg wie auch S-HDAg intrazellulär lokalisiert ist und nicht sezerniert wird [36; 61].

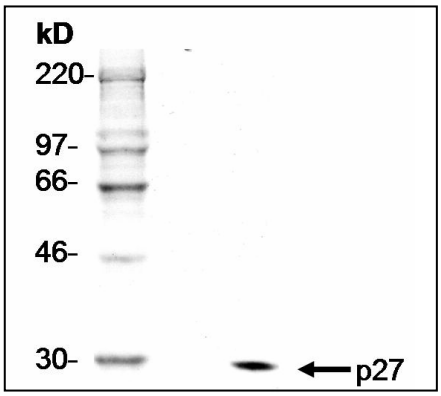

Abb. 13: Expression von L-HDAg (p27) durch Transfektanten.
P815/L-HDAg-Zellen wurden [^{35}S]-markiert, lysiert und das Protein p27 L-HDAg mittels eines polyklonalen HDAg-spezifischen Antiserums immunpräzipitiert.

Balb/c-Mäuse wurden mit pCMV/S-HDAg, pCMV/L-HDAg oder pCMV/L-HDAg-GFP DNA immunisiert und die CD8$^+$ T-Zell-Antworten und Antikörperantworten bestimmt:

(i) CD8$^+$ T-Zell-Antworten: Elf Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen generiert. Die Milzzellen wurden fünf Tage mit L-HDAg exprimierenden P815/L-HDAg Zellen (Abb. 13; [61]) restimuliert. Im [^{51}Cr]-Freisetzungstest (Abb. 14A) und auch in der zytofluorimetrischen Analyse INF-γ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen (Abb. 14B) konnten keine P815/L-HDAg-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen nachgewiesen werden. Somit konnten durch die HDAg kodierenden DNA-Impfstoffe keine zellulären Immunantworten induziert werden. Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den von Mauch C. et al.

beschriebenen Experimenten [61], in denen er HDAg-spezifsche ZTL nachweisen konnte.

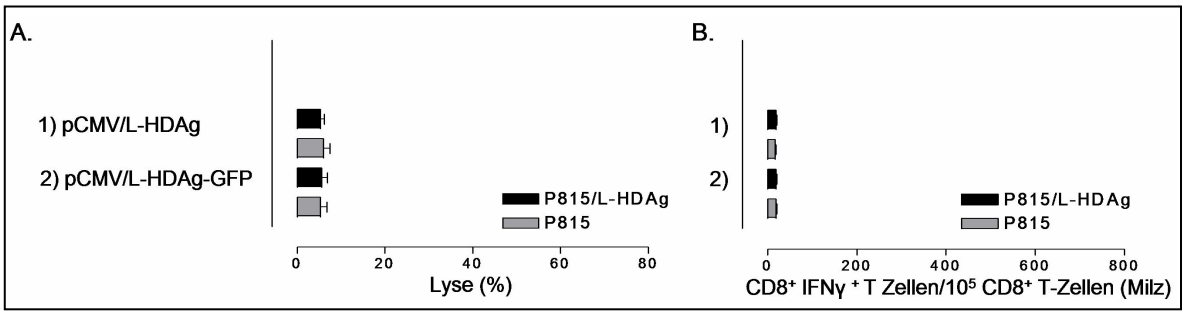

Abb. 14: Eine zelluläre Immunantwort gegen P815/L-HDAg war nicht nachweisbar.
Balb/c-Mäuse wurden mit 100 µg (1) pCMV/L-HDAg oder (2) pCMV/L-HDAg-GFP i.m. zweimal im Abstand von vier Wochen immunisiert. Zwölf Tage nach der Immunisierung wurden die Milzzellen der Tiere spezifisch mit L-HDAg exprimierenden Transfektanten *in vitro* restimuliert.
A) Nach fünftägiger Restimulation der Milzzellen mit P815/L-HDAg wurde in einem vierstündigen [^{51}Cr]-Freisetzungs-Assay die spezifische Lyse unter Verwendung von transfizierten P815/L-HDAg und nicht transfizierten P815 als Zielzellen getestet. Dargestellt ist die durchschnittliche Lyse ± SD von 3 Mäusen pro Gruppe bei einem Effektor/Zielzellen-Verhältnis von 20.
B) Ferner wurden die Milzzellen *ex vivo* während Brefeldin A-Behandlung 5 h mit P815/L-HDAg oder P815 restimuliert. Die Zellen wurden anschließend mit anti-CD8 mAk markiert, fixiert, intrazellulär für INF-γ gefärbt und zytofluorimetrisch analysiert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SD der Anzahl $CD8^+$ IFN-γ^+ T-Lymphozyten/ 10^5 Milzzellen von 3 Mäusen pro Gruppe.

(ii) Antikörperantworten: Mäuse wurden wie oben beschrieben immunisiert und Serumproben entnommen. pCMV/L-HDAg-GFP DNA immunisierte Mäuse induzierten deutliche HDAg-spezifische IgG-Antikörpertiter (Abb. 15A). Wie für die Plasmid-DNA-Immunisierung der Maus beschrieben [33], wurden präferentiell HDAg-spezifische IgG2a Subtyp-Antikörper induziert (Abb. 15B). pCMV/S-HDAg und pCMV/L-HDAg immunisierte Mäuse induzierten keine HDAg-spezifischen Antikörperantworten (Abb. 15A). Auch im Western Blot konnte allein bei den mit pCMV/L-HDAg-GFP immunisierten Mäusen eine HDAg-spezifische Antikörperantwort detektiert werden (Abb. 15C). Mäuse, die mit dem GFP-exprimierenden pCMV/GFP Kontrollplasmid immunisiert waren, zeigten keine Kreuzreaktivität gegen das HDAg (Abb. 15A und C). Somit konnte gezeigt werden, dass nur das L-HDAg-GFP Fusionskonstrukt in der Lage war, effektiv Antikörper gegen das Hepatitis D δ-Antigen zu induzieren.

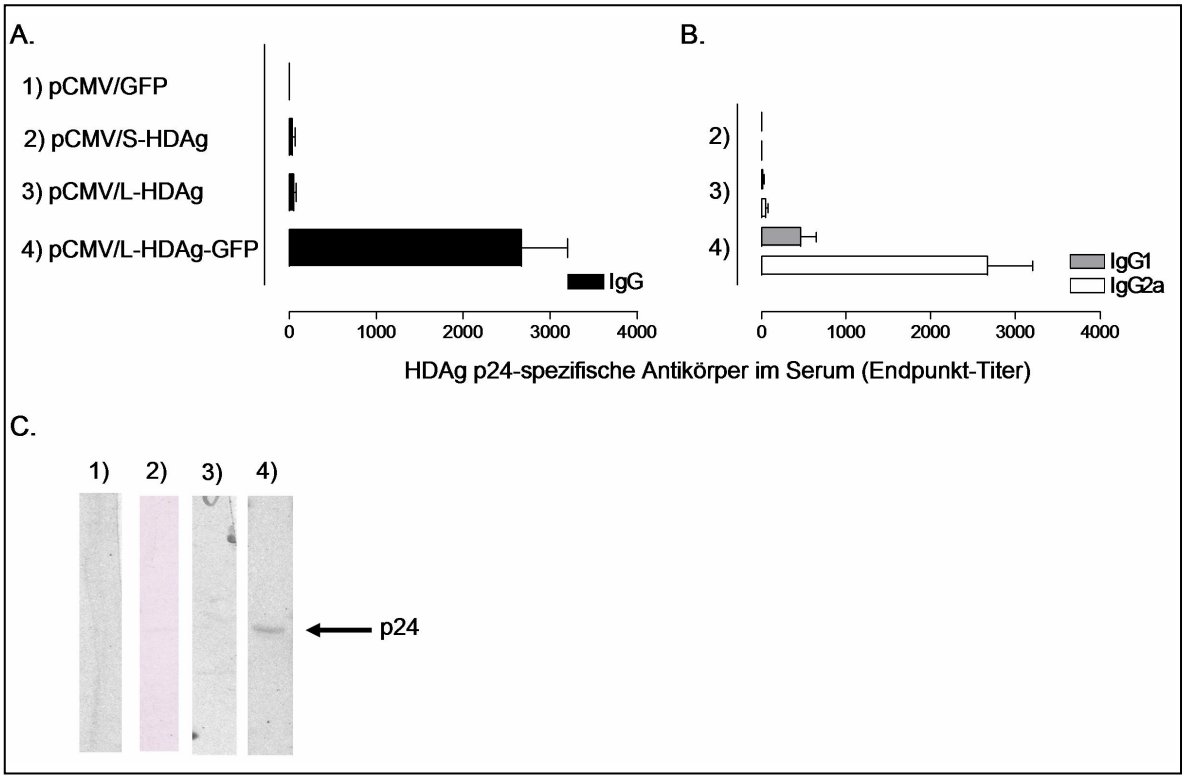

Abb. 15: HDAg p24-spezifische Antikörperantworten nach Immunisierung mit für HDAg kodierenden DNA-Impfstoffen.
Balb/c-Mäuse wurden zweimal mit 100 µg (1) pCMV/GFP, (2) pCMV/S-HDAg, (3) pCMV/L-HDAg und (4) pCMV/L-HDAg-GFP Plasmid-DNA i.m immunisiert. Nach weiteren vier Wochen erfolgte die Bestimmung der HDAg p24-spezifischen Serumantikörper mittels **(A)** ELISA und **(C)** Western Blot (1:50 Verdünnung). **(B)** Zudem wurden die IgG-Subtypen der IgG-Antikörper bestimmt. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SD der Ak-Titer von 3 Mäusen pro Gruppe.

Um auszuschließen, dass Tiere, bei denen keine Antikörper nachzuweisen waren, später Antikörperantworten ausbildeten, wurde bei einmalig mit pCMV/L-HDAg oder pCMV/L-HDAg-GFP immunisierten Balb/c-Mäusen zwei, vier, acht und zehn Wochen nach der Immunisierung Schwanzblut zur Bestimmung der Antikörper entnommen. Bei den mit pCMV/L-HDAg immunisierten Tieren waren an allen Zeitpunkten überhaupt keine Antikörpertiter nachweisbar (Abb. 16). Hingegen konnte bis zu zehn Wochen nach einer einmaligen Immunisierung mit pCMV/L-HDAg-GFP eine deutliche HDAg-spezifische Antikörperantwort gemessen werden, wobei vier bis sechs Wochen nach der Immunisierung das Maximum der Antikörpertiter erreicht wurde (Abb. 16). Ein Abstand von vier Wochen nach der Immunisierung erwies sich folglich als ein geeigneter Zeitpunkt für die Serumentnahme zur Bestimmung von Hepatitis D p24 Antigen-spezifischen Antikörpern.

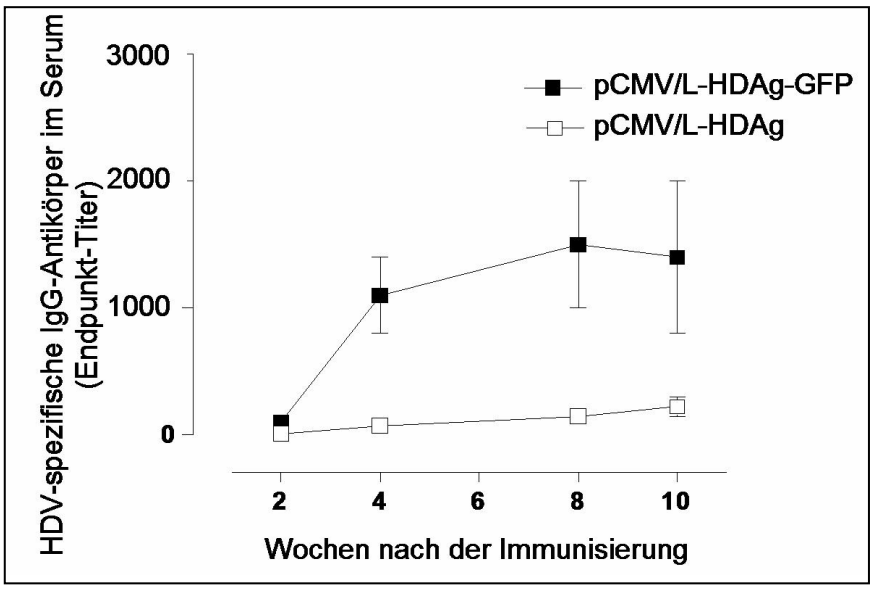

Abb. 16: Langzeitverlauf HDAg p24-spezifischer Antikörper nach DNA-Immunisierung. Balb/c-Mäuse wurden mit 100 µg pCMV/L-HDAg-GFP und pCMV/L-HDAg i.m. immunisiert. Nach zwei, vier, acht und zehn Wochen erfolgte die Bestimmung HDAg-spezifischer Antikörper im Serum der Tiere mittels ELISA. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SD der Ak-Titer von 3 Mäusen pro Gruppe.

3.2.1 Identifizierung einer GFP-spezifischen Hilfsfunktion für die Induktion von HDAg-spezifischen Antikörpern

Die effiziente Generierung von HDAg-spezifischen Antikörpern mit dem pCMV/L-HDAg-GFP Konstrukt deutete auf eine Hilfsfunktion der GFP-Domäne hin. Es war gezeigt, dass das GFP-Protein $CD4^+$ Helferepitope enthält, die effizient $CD4^+$ T-Zellen aktivieren und die Ausbildung von humoralen Immunantworten erleichtern können [82; 99; 118]. Um dies zu prüfen, wurden B6-Mäuse und MHC-Klasse-II-defiziente $A\alpha^{-/-}$-Mäuse [46] mit pCMV/L-HDAg-GFP immunisiert. Durch das Fehlen der MHC-Klasse-II-restringierten Antigenpräsentation können $A\alpha^{-/-}$-Mäuse nahezu keine stabile $CD4^+$ T-Zell-Population ausbilden (Abb. 17B). pCMV/L-HDAg-GFP immunisierte B6-Mäuse, aber nicht die $A\alpha^{-/-}$-Mäuse, induzierten HDAg-spezifische Antikörper (Abb. 17A). Die Induktion von HDAg spezifischen Antikörpern war somit $CD4^+$ T-Zell-abhängig.

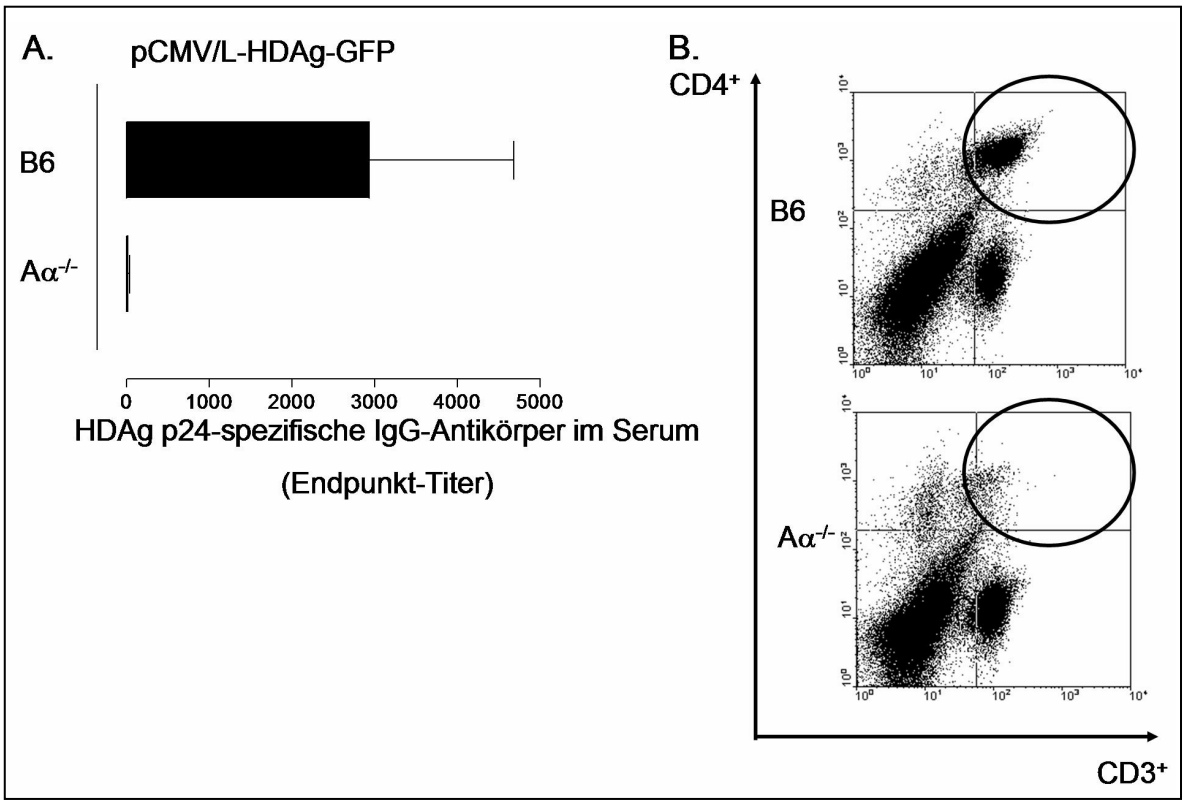

Abb. 17: $CD4^+$ T-Zell-Abhängigkeit der GFP-vermittelten Hilfe.
A) B6- und MHC-Klasse-II-defiziente $A\alpha^{-/-}$-Mäuse wurden zweimal mit 100 µg pCMV/L-HDAg-GFP i.m. im Abstand von vier Wochen immunisiert. Nach weiteren zwei Wochen wurden die Serumantikörper mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SD der Ak-Titer von 3 Mäusen pro Gruppe.
B) Zytofluorimetrische Analyse der Milzzellen von B6- und $A\alpha^{-/-}$-Mäusen. Die Abbildung zeigt den Verlust an $CD4^+$ T-Zellen ($CD4^+$ und $CD3^+$) bei $A\alpha^{-/-}$-Mäusen im Vergleich zu B6-Mäusen.

Die GFP-Spezifität der Helfer-Determinanten wurde mit GFP-transgenen (GFP-tg) Mäusen überprüft [41; 70]. GFP-tg Mäuse haben den gleichen genetischen Hintergrund wie B6-Mäuse und exprimieren in allen Geweben das GFP (unter der Kontrolle eines β-Aktin-Promotors). Durch die ständige Expression des GFP-Proteins sind GFP-tg Mäuse tolerant gegenüber dem GFP. Wie zu erwarten war, entwickelten die GFP-tg Mäuse keine Antikörper gegen das p24 Antigen (Abb. 18). Die $CD4^+$ T-Zell-Hilfe für die Induktion von HDAg-spezifischen Antikörpern war somit GFP-spezifisch.

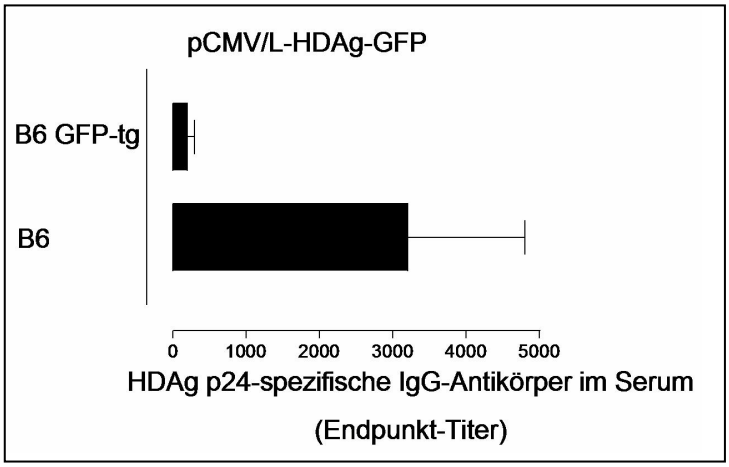

Abb. 18: GFP-spezifische Abhängigkeit der Hilfe.
B6- und GFP-tg Mäuse (die tolerant gegenüber GFP sind) wurden mit 100 µg pCMV/L-HDAg-GFP immunisiert. Nach vier Wochen wurden die HDAg-spezifischen Serumantikörper mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SD der Ak-Titer von 3 Mäusen pro Gruppe.

3.2.2 Konstruktion von HSP73-assoziierten chimären Fusionsproteinen

In unserer Arbeitsgruppe wurde aus dem T-Antigen des SV40 Virus ein eukaryontisches Expressionssystem entwickelt, das die effiziente Expression schwierig zu exprimierender Proteine und Proteindomänen erlaubt. Werden C-terminal Proteine an die N-terminalen 272 Aminosäuren des zytosolischen SV40 T-Ag (cT272) fusioniert, resultiert dies in einer stabilen HSP73-assoziierten Expression chimärer Fusionskonstrukte. Es kommt zu einer Akkumulation der HSP73/ Antigen-Komplexe. Da Stressproteine sowohl das angeborene Immunsystem aktivieren als auch die Induktion einer spezifischen Immunantwort unterstützen [25; 106], induzieren Immunisierungen mit Plasmid-DNA, die für HSP73-assoziierte Fusionsproteine kodieren, effizient sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten gegen die C-terminal fusionierten Antigene [83; 90].
Die Sequenz des L-HDAg wurde C-terminal an die HSP73-bindende cT272 Domäne (in fortlaufendem Leserahmen) kloniert. Der daraus resultierende Expressionsvektor pCMV/cT272-L-HDAg exprimierte das HSP73-assoziierte cT272-L-HDAg Fusionsprotein (Abb. 19B). Die HSP73/cT272-L-HDAg Komplexe akkumulierten in den transfizierten Zellen zu Mengen, die einfach mit Coomassie Blau Färbung nachgewiesen werden konnten (Abb. 19A).

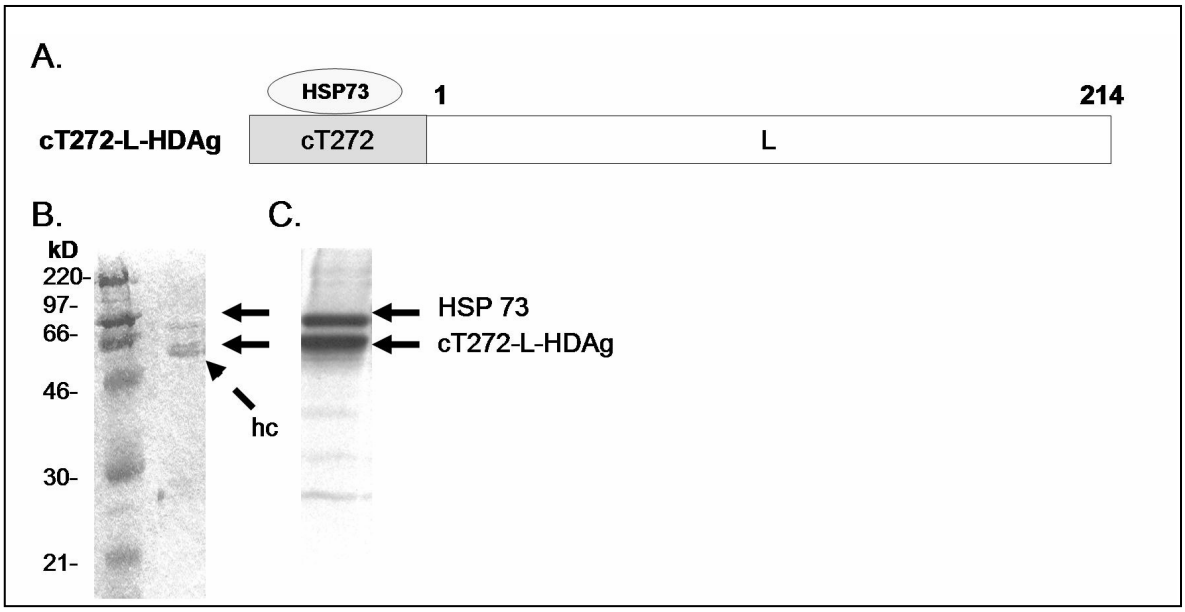

Abb. 19: Proteinexpression von pCMV/cT272-L-HDAg.
A) DNA-kodiertes cT272-L-HDAg Fusionskonstrukt.
B) HEK293-Zellen wurden transient mit pCMV/cT272-L-HDAg transfiziert. Aus dem Lysat der Zellen wurde das Protein cT272-L-HDAg mit einem T-Antigen spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und mit Coomassie Blau gefärbt. Das Protein cT272-L-HDAg, HSP73 und die schwere Kette (hc, *heavy chain*) des Antikörpers sind mit Pfeilen gekennzeichnet.
C) HEK293-Zellen wurden transient mit pCMV/cT272-L-HDAg transfiziert, [^{35}S]-Methionin markiert, lysiert und das Protein cT272-L-HDAg mit einem T-Antigen-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Das Protein cT272-L-HDAg und das mit ihm assoziierte HSP73 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Balb/c-Mäuse wurden mit pCMV/cT272-L-HDAg zweimal im Abstand von vier Wochen immunisiert. Die Mäuse entwickelten effizient HDAg-spezifische Serumantikörper (Abb. 20). Somit trägt auch die cT272-Domäne oder das assoziierte HSP73 eine Hilfsfunktion für die $CD4^+$ T-Zell-abhängige Antikörperbildung gegen das Hepatitis D δ-Antigen.

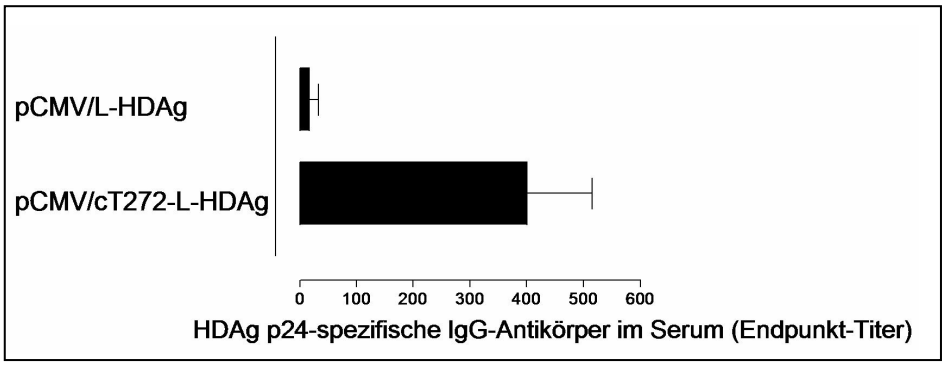

Abb. 20: HSP73-bindendes cT272-L-HDAg-Fusionskonstrukt kann effektiv Antikörper gegen Hepatitis D p24-Antigen induzieren.
Balb/c-Mäuse wurden zweimal mit 100 µg pCMV/L-HDAg und pCMV/cT272-L-HDAg im Abstand von vier Wochen i.m immunisiert. Nach weiteren zwei Wochen wurden die Serumantikörper mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SD der Ak-Titer von 3 Mäusen pro Gruppe.

Ein großer Vorteil des HSP73-regulierten Expressionsystems ist, dass nicht nur schwierig exprimierbare Proteine sondern auch Proteindomänen effizient synthetisiert werden. Dieses System wurde schon erfolgreich für die Kartierung von CD8+ T-Zell-Epitopen benutzt [90]. Um mögliche Domänen des Hepatitis D δ-Antigens für die Induktion von Antikörpern zu kartieren, wurden im Folgenden drei überlappende Fragmente des L-HDAg an das HSP73-bindende cT272 fusioniert und in hCMV-regulierte Expressionsplasmide kloniert: Fragment 1 kodiert das L-HDAg Fragment 1 bis 83 (pCMV/cT272-L1-HDAg); Fragment 2 kodiert das L-HDAg Fragment 79 bis 158 (pCMV/cT272-L2-HDAg) und Fragment 3 kodiert das L-HDAg Fragment 141 bis 214 (pCMV/cT272-L3-HDAg) (Abb. 21A). Transient transfizierte HEK293-Zellen exprimierten effizient die HSP73-assoziierten Fusionsproteine cT272-L1-HDAg, cT272-L2-HDAg und cT272-L3-HDAg (Abb. 21B).

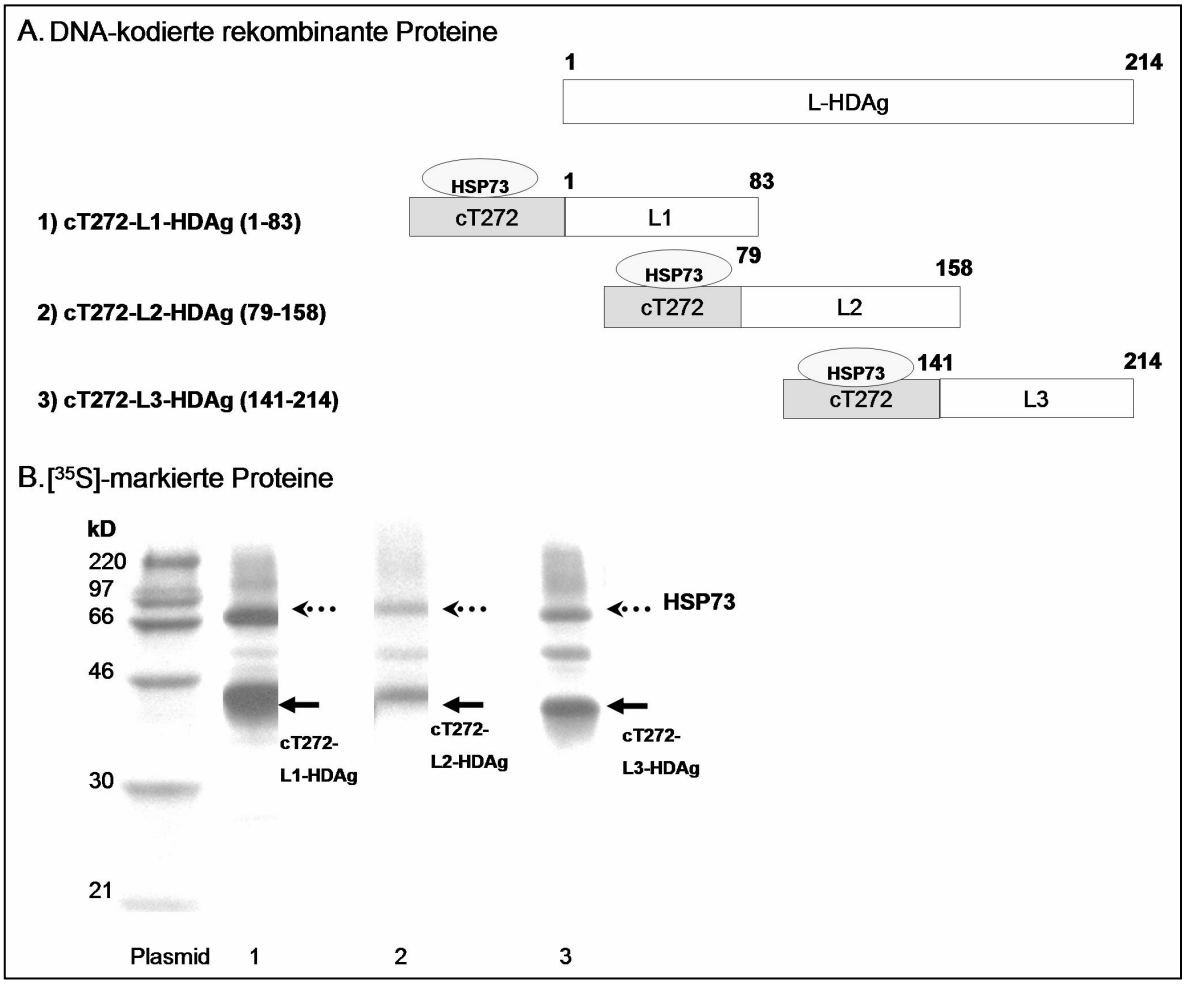

Abb. 21: HSP73-bindende cT272-L-HDAg-Fusionskonstrukte.
A) DNA-kodierte rekombinante Proteine. Fragmente des L-HDAg wurden in fortlaufendem Leserahmen in den Expressionsvektor pE1/cT272-Ek-His hinter die HSP73-bindende DnaJ-Domäne des SV40 T-Antigens kloniert. (1) pCMV/cT272-L1-HDAg kodiert das Fragment 1 bis 83, (2) pCMV/cT272-L2-HDAg kodiert das Fragment 79 bis 158 und (3) pCMV/L3-HDAg kodiert das Fragment 141 bis 214.
B) [^{35}S]-markierte Proteine. HEK293-Zellen wurden transient mit (1) pCMV/cT272-L1-HDAg, (2) pCMV/cT272-L2-HDAg und (3) pCMV/cT272-L3-HDAg transfiziert, [^{35}S]-Methionin markiert, lysiert und die Proteine (1) cT272-L1-HDAg, (2) cT272-L2-HDAg und (3) cT272-L3-HDAg mit einem T-Antigen-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Die Proteine und das mit ihnen assoziierte HSP73 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Balb/c-Mäuse wurden mit den Immunisierungsvektoren zweimalig im Abstand von vier Wochen immunisiert. Es zeigte sich, dass nur pCMV/cT272-L1-HDAg immunisierte Tiere eine effiziente Antikörperantwort gegen das HDAg entwickelten (Abb. 22). Auffällig war, dass in pCMV/cT272-L1-HDAg immunisierten Tieren 4 bis 8mal höhere Antikörpertiter als in pCMV/cT272-L-HDAg (kodiert das gesamte L-HDAg) immunisierten Mäusen (Abb. 22) nachweisbar waren. Mit dem HSP73-regulierten Expressionssystem konnte somit das erste Drittel von Hepatitis D δ-Antigen als wichtiger Teil für die Induktion von Antikörpern identifiziert werden.

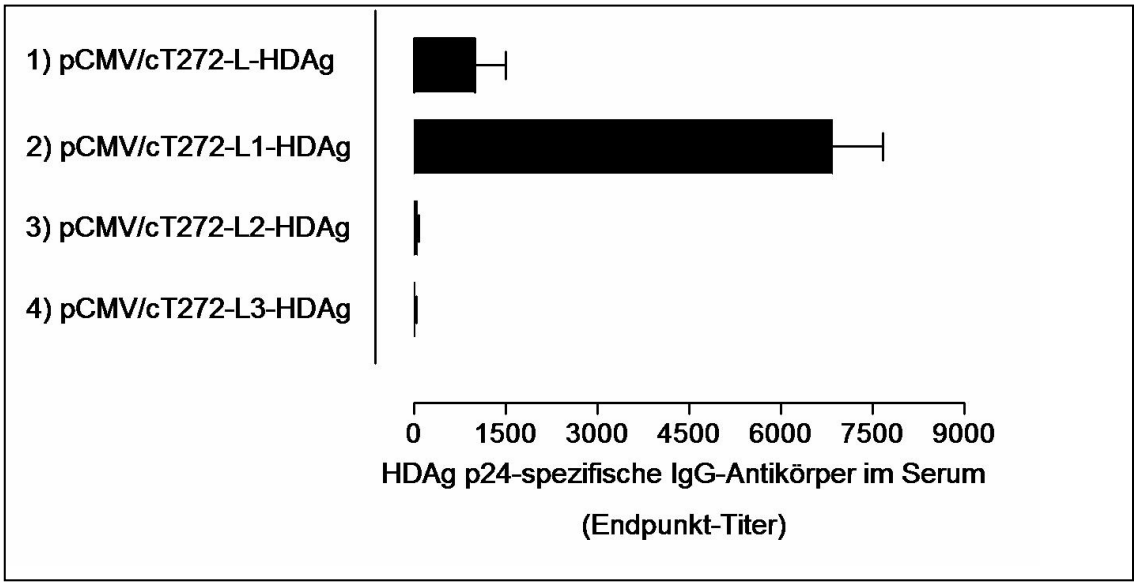

Abb. 22: Identifikation einer wichtigen Domäne des Hepatitis D δ-Antigen für die Induktion von Antikörpern.
Balb/c-Mäuse wurden zweimalig im Abstand von vier Wochen mit 100 µg (1) pCMV/cT272-L-HDAg, (2) pCMV/cT272-L1-HDAg, (3) pCMV/cT272-L2-HDAg und (4) pCMV/cT272-L3-HDAg i.m. immunisiert. Nach weiteren vier Wochen wurden die HDAg p24-spezifischen Antikörper im Serum mittels ELISA bestimmt. Für die mit pCMV/cT272-L1-HDAg immunisierten Mäuse konnten 4 bis 8fach höhere Antikörpertiter als für die mit pCMV/cT272-L-HDAg immunisierten Mäuse gemessen werden. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SD der Ak-Titer von 3 Mäusen pro Gruppe.

4. DISKUSSION

4.1 Das Hepatitis D Virus δ-Antigen

Mit den in der Arbeit verwendeten L-HDAg-kodierenden Immunisierungsvektoren konnten weder $CD8^+$ T-Zell-Antworten (Abb. 14) noch humorale Immunantworten (Abb. 15) induziert werden. Auch rekombinante HDAg-Präparationen waren nur schwach immunogen für die Induktion von Antikörperantworten. Es ist außergewöhnlich, dass ein ca. 200 Aminosäuren großes Protein nahezu keine Immunogenität für B-Zellen aufweist. Dies konnte auch in anderen Spezies (z.B. in Murmeltieren) bestätigt werden [26; 27; 35; 36; 79]. Ebenfalls negativ waren Immunisierungen mit DNA-Impfstoffen, die ein sezerniertes HDAg kodierten [61]. Im Gegensatz dazu können im natürlichen HDV-Infektionszyklus in der Regel hohe Antikörpertiter gemessen werden [110]. Allerdings wird während einer HDV-Infektion HDAg niemals alleine präsentiert, sondern immer assoziiert mit HBsAg. Es gab keinen Hinweis darauf, dass rekombinantes HDAg Immunantworten gegen ko-applizierte Proteine supprimiert (Abb. 10). Somit ist eine fehlende Immunogenität für B-Zellen und nicht eine immunsuppressive Wirkung eine außerordentliche Eigenschaft dieses Proteins. Aus diesen Gründen wurde das HDV δ-Antigen ausgewählt, um Helfer-Signale zu analysieren, die nötig sind, um eine spezifische Antikörperantwort gegen schwach immunogene, virale Produkte hervorzurufen.

4.2 Charakterisierung der $CD4^+$ T-Zell-Hilfe für die Induktion von HDAg-spezifischen Antikörpern

Immunstimulierende Oligodesoxynukleotide (ODN), die spezifische CpG-Motive enthalten, aktivieren das angeborene Immunsystem und stimulieren die Immunantworten von rekombinanten Antigenen (Übersichtsartikel: Krieg [47]). Immunstimulierende ODN können durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems bei der Induktion von spezifischen MHC-Klasse-I-restringierten $CD8^+$ T-Zell-Antworten den Bedarf an einer spezifischen $CD4^+$ T-Zell-Hilfe ersetzen [114]. Die Ko-Applikation von rekombinantem HBsAg mit immunstimulierenden ODN1826 verstärkte die HBsAg-spezifische Antikörperantwort und änderte die Polarisierung dieser Immunantwort in Richtung Th1, was an der präferentiellen Produktion von IgG2-Antikörpern beobachtet werden konnte (Abb. 9). Im Gegensatz dazu stimulierte die Ko-Applikation von p24 HDAg mit ODN1826 nicht die HDAg-spezifischen Immunantworten (Abb. 8). Somit konnte durch die ODN-vermittelte Aktivierung des angeborenen Immunsystems keine HDAg-spezifische Stimulierung der B-Zellen erreicht werden.

$CD4^+$ T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion von humoralen und zellulären Immunantworten. In der Regel müssen für eine effiziente humorale Immunantwort neben den B-Zellen auch die $CD4^+$ T-Lymphozyten aktiviert werden. Eine Möglichkeit die $CD4^+$ T-Zellen spezifisch zu stimulieren, besteht darin, Proteine, die $CD4^+$ T-Helferzell-Epitope enthalten, in der Vakzine zu ko-applizieren. Bei einigen Proteinen wie z.B. OVA, HBsAg und HBcAg konnten $CD4^+$ T-Zell-Epitope, die eine $CD4^+$ T-Zell-Hilfe hervorrufen, identifiziert werden [7; 12; 63]. Die $CD4^+$ T-Zell-abhängige „Hilfe“ konnte hervorgerufen werden, wenn rekombinantes HDAg mit einem Helfer-Protein gemischt wurde (Abb. 10, 11). Bei den Immunisierungen mit rekombinanten Proteinen ist somit eine „kombinierte“ Erkennung von Antikörper-bindenden und T-Zell-stimulierenden Epitopen auf dem gleichen Molekül für diese $CD4^+$ T-Zell-abhängige „Hilfe“ nicht notwendig. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass HDAg mit OVA, HBcAg oder HBsAg Bindungen eingeht oder Komplexe bildet. Desweiteren würde man erwarten, dass beide Antigene (HDAg und z.B. HBsAg) von einer Zelle präsentiert werden [38]. Wurde HDAg als DNA-Vakzine appliziert, so konnte die $CD4^+$ T-Zell-abhängige „Hilfe“ durch

die Fusion von GFP an HDAg induziert werden (Abb. 15). Die GFP-Spezifität dieser Helfer-Determinanten konnte mit GFP-transgenen (GFP-tg) Mäusen bestätigt werden [41; 70]. GFP-tg Mäuse, die tolerant gegenüber GFP sind, entwickelten keine HDAg-spezifischen Antikörper nach Immunisierung mit dem für das Fusionsprotein L-HDAg-GFP kodierenden Vektor (Abb. 18).

Auch durch die Fusion des SV40 T-Antigens bzw. durch assoziiertes HSP73 an HDAg wurden HDAg-spezifische Antikörper induziert. Es ist nicht bekannt, ob die cT272-Fusionskonstrukte durch die Assoziation mit HSP73 eine verstärkte Stimulierung der B-Zellen erreichen [90] und/oder ob die $CD4^+$ T-Zell-definierten T-Antigen-Epitope die „Hilfe“ in diesem System vermitteln. Die Abhängigkeit bei der Induktion HDAg-spezifischer Antikörper von $CD4^+$ T-Helferzellen wurde in den MHC-Klasse-II-defizienten $A\alpha^{-/-}$-Mäusen bestätigt. In $A\alpha^{-/-}$-Mäusen konnten keine HDAg-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 17). Dies lässt vermuten, dass ein größerer Beitrag zur „Hilfe“ von den $CD4^+$ T-Zell-spezifischen T-Antigen-Epitopen geleistet wird. Von Huang Y.H. et al. konnte gezeigt werden, dass die HDAg-spezifischen Antikörper durch eine DNA-Vakzine, die für ein getrennt exprimiertes HBsAg und HDAg kodiert, nicht verbessert werden konnten [36]. Dies weist darauf hin, dass bei den DNA-Vakzinen HDAg und die $CD4^+$ T-Zell-Epitope auf einem Molekül lokalisiert sein müssen, um die $CD4^+$ T-Zell-abhängige Hilfe effizient hervorzurufen.

Viele verschiedene heterologe Antigene wie Kern- oder Oberflächenproteine des Hepatitis B Virus´, das SV40 T-Antigen oder OVA konnten die $CD4^+$ T-Zell-abhängige „Hilfe“ induzieren. Dies spricht dafür, dass die Quelle der $CD4^+$ T-Zell-stimulierenden Determinanten mit keinen besonderen Eigenschaften ausgestattet sein muss. Zudem besitzt HBsAg, der natürliche Transporter für HDAg, keine privilegierte Rolle bei der Verstärkung der HDAg-spezifischen Immunantwort gegenüber anderen Antigenen.

Um Antikörper hervorzurufen, muss ein Antigen zur Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen in der Regel über den exogenen Prozessierungsweg von Antigen-präsentierenden Zellen prozessiert werden. Präferentiell werden rekombinante Proteine und sezernierte DNA-kodierte Proteine exogen prozessiert. Endogene DNA-Impfstoffe können effizient Antikörper über den Weg des *Cross Priming* induzieren. Dabei wird das DNA-kodierte Antigen von normalen Körperzellen wie z.B. einem Myozyten

synthetisiert und anschließend das synthetisierte Antigen von Antigen-präsentierenden Zellen internalisiert und exogen prozessiert. Das *Cross Priming* wird verbessert, wenn Antigene toxische Eigenschaften aufweisen und dadurch vermehrt Zellen, die das Antigen synthetisiert haben, zugrunde gehen und von APZ internalisiert werden. Im Überstand von transient transfizierten Zellen konnte kein L-HDAg nachgewiesen werden (Abb. 12B), d.h. die HDV-Proteine werden nicht sezerniert. Andere Arbeitsgruppen fanden ebenfalls keine Hinweise auf eine Sezernierung von HDAg [35; 61]. Dies widerspricht nicht der Tatsache, dass bei HDV-infizierten Patienten HDAg im Serum nachgewiesen werden kann, da im natürlichen Infektionszyklus HDAg nicht direkt, sondern verpackt in HBsAg-Partikel sezerniert wird. In der vorliegenden Arbeit konnten bei der Induktion von HDAg-spezifischen Antikörpern keine signifikanten Unterschiede zwischen Vakzinierung mit DNA und Vakzinierung mit rekombinanten Proteinen festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass die DNA-kodierten HDAg-Fusionsproteine über den Weg des *Cross Priming* effizient Antikörper induzieren, wobei weder von HDAg noch von den fusionierten Proteinen Zell-schädigende Eigenschaften bekannt sind [32]. Sowohl bei den endogenen als auch bei den exogenen HDAg-Vakzinen war für die erfolgreiche HDAg-spezifische Stimulierung der B-Zellen spezifische $CD4^+$ T-Zell-Hilfe erforderlich.

Von Huang Y.H. et al. wurden unter anderem Vakzinierungsversuche mit DNA, die für ein L-HDAg mit mutierter Isoprenylierungsstelle kodiert, durchgeführt [35]. Durch die fehlende Isoprenylierung kam es zu einer Konformationsänderung von L-HDAg, wodurch die Induktion von Antikörpern gegen L-HDAg verbessert werden konnte. Es ist denkbar, dass auch durch die Fusion von GFP oder cT272 an L-HDAg die Zugänglichkeit von L-HDAg-spezifischen Antikörperbindungsstellen deutlich verändert wird. Dem widerspricht allerdings, dass mit pCMV/L-HDAg-GFP, mit dem in B6-Mäusen erfolgreich Antikörper induziert werden konnten, in den GFP-transgenen B6-Mäusen keine Antikörper hervorgerufen werden konnten. Auch bei der Applikation von HDAg gemischt mit unspezifischen Proteinen, von denen keine Einflüsse auf die Konformation von HDAg bekannt sind, konnten erfolgreich Antikörper induziert werden. Zudem wurde die deutliche Abhängigkeit der erfolgreichen Induktion HDAg-spezifischer Antikörper von der $CD4^+$ T-Zell-Hilfe gezeigt. Somit kann nahezu ausgeschlossen werden, dass in den Versuchen

konformationelle Änderungen für die Induzierbarkeit von HDAg-spezifischen Antikörpern entscheidend verantwortlich waren.

4.3 Anwendung HSP73-assoziierter DNA-Vakzinen auf schwache virale Antigene

Das HSP73-assoziierte Expressionssystem konnte erfolgreich auf HDAg angewandt werden. Die Expression von L-HDAg als cT272-L-HDAg-Fusionsprotein wurde deutlich verbessert (Abb. 19). Auch Fragmente von L-HDAg konnten als HSP73-assoziierte Fusionskonstrukte problemlos exprimiert werden (Abb. 21). Dadurch, dass Stressproteine sowohl das angeborene Immunsystem aktivieren als auch die Induktion einer spezifischen Immunantwort unterstützen [25; 106], induzieren Immunisierungen mit Plasmid-DNA, die für HSP73-assoziierte Fusionsproteine kodieren, effizient sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten gegen die C-terminal fusionierten Antigene [83; 90]. Mit den HSP73-assoziierten DNA-Vakzinen war die erfolgreiche Induzierung von Antikörpern möglich (Abb. 20 und 22), da entweder von cT272 oder dem assoziierten HSP73 eine $CD4^+$ T-Zell-abhängige Hilfe hervorgerufen werden konnte. Somit brachten die DNA-Immunisierungen, in denen die HSP73-assoziierte Expression der HDAg-Fragmente untersucht wurde, zwei wichtige Erkenntnisse hervor:

(i) Das System erlaubte die Identifizierung von Antikörper-bindenden Domänen bei viralen Antigenen mit einer schwachen intrinsischen Immunogenität.

(ii) Die Immunogenität von Antikörper-bindenden Epitopen wurde offensichtlich verstärkt, wenn sie isoliert präsentiert wurden (Abb. 22).

Da die Detektion der Antikörperantworten, die durch die HSP 73-assoziierten DNA-Vakzinen induziert wurden, mittels nativem, rekombinantem p24 HDAg im ELISA erfolgte, kann davon ausgegangen werden, dass die größte Fraktion der Antikörper direkt gegen Determinanten gerichtet ist, die auch auf dem nativen viralen Antigen vorhanden sind. Die Zugänglichkeit und/oder die Immunogenität dieser Determinanten wurden scheinbar verstärkt, wenn große Fragmente des Antigens deletiert wurden. Die Analysen zeigten, dass eine immunodominante Antikörperantwort gegen p24 HDAg durch die für den N-terminalen HDAg-Bereich kodierende DNA-Vakzine hervorgerufen wird (Abb. 22). Dies lässt vermuten, dass

eine oder mehrere HDAg-spezifischen Antikörper-Domänen auf dem N-terminalen Ende von HDAg lokalisiert sind.

B-Zellen, die spezifisch sind für genau definierte, immunodominante lineare Peptidmotive, zeigen häufig keine Kreuzreaktivität gegenüber biologisch wichtigen konformationellen Epitopen des nativen HDAg [8; 76]. Daher wurden in der Arbeit die genauen Spezifitäten der HDAg-spezifischen Antikörper nicht charakterisiert. Zusammenfassend weist diese Datenlage auf den praktischen Wert hin, alternative Expressionssysteme bei DNA-Vakzinen einzusetzen, um ein erweitertes Immunogenitätsprofil von „schwierigen“ Antigenen zu erhalten.

4.4 Die Rolle der HDV-Antikörper im Infektionszyklus

HDV-infizierte Patienten entwickeln Antikörper gegen verschiedene Epitope der HDV-Proteine, wobei die Höhe der Antikörpertiter mit der Replikationsrate des HDV korreliert. Die Antikörper scheinen jedoch keinen Einfluss auf die klinische Prognose der Patienten zu haben [8; 69; 76]. Da die Epitope, gegen die die Antikörper gerichtet sind, nicht auf der Oberfläche der Viruspartikel lokalisiert sind, sind diese nicht in der Lage, die Viruspartikel zu neutralisieren. Im Gegenteil: Es gibt Hinweise darauf, dass HDV-Antikörper die Erkrankung auch verschlechtern können [40]. Dies könnte auf der Tatsache beruhen, dass infizierte Zellen, die HDV-Proteine beinhalten, mit diesen Antikörpern reagieren, was zu einer weiteren Leberschädigung führt. Somit ist als wichtigster Schutz gegen eine HDV-Infektion die Hepatitis B-Impfung anzusehen. Sie bewahrt vor einer Hepatitis B-Infektion und schützt folglich auch vor einer HDV-Infektion.

Aus diesen Gründen sind die Versuche mit dem HDV ausschließlich als Modell zu verstehen, an dem die Induzierbarkeit von Antikörpern gegen Antigene mit schwacher intrinsischer Immunogenität für B-Zellen untersucht wurde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die effiziente Induktion von Antikörpern stellt einen wesentlichen Beitrag zur Generierung erfolgreicher Impfstoffe dar. Viele Antigene besitzen eine schwache Immunogenität für B-Zellen, obwohl sie sichere Antikörper-bindende Epitope enthalten. Für die erfolgreiche Entwicklung von Antikörper-induzierenden Vakzinen ist es notwendig $CD4^+$ T-Zell-vermittelte Hilfsfunktionen hervorzurufen, um effizient Antikörper gegen subdominante oder kryptische Epitope schwach immunogener Antigene zu induzieren. In diesem Zusammenhang stellt die Identifizierung Antikörper-bindender Epitope auf nativen Antigenen mit defizienter Immunogenität eine weitere Herausforderung dar. Als Modell für Antigene mit schwacher intrinsischer Immunogenität wurde das δ-Antigen des Hepatitis D Virus (HDAg) herangezogen. Es weist trotz seiner ungefähren Größe von 200 Aminosäuren und sicherer Antikörper-bindender Epitope eine sehr schwache Immunogenität für B-Zellen auf.

Im ersten Teil der Arbeit wurde rekombinantes HDAg untersucht. Dabei konnte die schwache Immunogenität des HDAg für B-Zellen bestätigt werden. Auch durch die Zugabe von Oligodesoxynukleotiden, die das angeborene Immunsystem aktivieren, war die humorale Immunantwort gegen HDAg nicht zu steigern. Wurde jedoch das Hüllprotein des Hepatitis B Virus (HBsAg) mit HDAg ko-appliziert, so waren in den immunisierten Mäusen deutliche HDAg-spezifische Antikörpertiter zu messen. Dies konnte auch für die Ko-Applikation von HDAg mit anderen Proteinen gezeigt werden, wobei HBsAg keine privilegierte Rolle für die Induktion von HDAg-spezifischen Antikörpern zugeschrieben werden konnte.

Im zweiten Teil wurde untersucht, inwieweit mit DNA-Impfstoffen, die für HDAg kodieren, HDAg-spezifische Antikörper induziert werden können. Entsprechend den Proteinimmunisierungen entwickelten die immunisierten Mäuse auch hier keine Antikörper nach einer Vakzinierung mit einem allein für HDAg kodierenden Plasmid. Im Gegensatz dazu wurden nach Immunisierungen mit einem Plasmid, das für ein Fusionsprotein aus HDAg und dem *green fluorescent protein* (GFP) kodiert, deutliche HDAg-spezifische Antikörpertiter gemessen. Die effiziente Generierung von HDAg-spezifischen Antikörpern mittels des für das Fusionsprotein HDAg-GFP kodierenden Konstrukts deutete auf eine $CD4^+$ T-Zell-

vermittelte Hilfsfunktion der GFP-Domäne hin. Dies konnte eindrucksvoll in $A\alpha^{-/-}$ (keine $CD4^+$ T-Zellen) und in GFP-transgenen (tolerant gegenüber GFP) Mäusen bestätigt werden. $A\alpha^{-/-}$ und GFP-transgene Mäuse entwickelten nach DNA-Immunisierung mit dem für das Fusionsprotein HDAg-GFP kodierenden Vektor keine Antikörper.

Ähnliche Befunde zeigten sich in einem Stressprotein-regulierten Expressionssystem. Stressproteine (*heat shock protein*, HSP) sind natürliche Adjuvantien, die das angeborene Immunsystem direkt stimulieren können. Durch eine C-terminale Fusion von Antigenen an die HSP73-bindende Domäne des *Simian Virus 40* T-Antigens können chimäre Fusionsproteine stabil exprimiert werden. Ein HSP73-assoziiertes Fusionsprotein zwischen der HSP73-bindenden Domäne und dem HDAg induzierte Antikörper gegen HDAg. Die $CD4^+$ T-Zell-Hilfe wurde dabei entweder vom assoziierten HSP73 oder von der HSP73-bindenden Domäne cT272 (N-terminale 272 Aminosäuren des *Simian Virus 40* T-Antigens) induziert. Unter Verwendung dieses Expressionssystems konnte zudem eine immundominante Domäne auf dem N-Terminus des HDAg (Aminosäuren 1 bis 83) identifiziert werden. Die Immunogenität gegen diese Domäne war verstärkt (6-8fach), wenn diese Domäne isoliert exprimiert wurde. Diese Ergebnisse lieferten somit wichtige Erkenntnisse über die $CD4^+$ T-Zell-vermittelte Induktion von Antikörpern für Antigene mit schwacher Immunogenität für B-Zellen.

6. LITERATUR

1. **Akbari, O., Panjwani, N., Garcia, S., Tascon, R., Lowrie, D., and Stockinger, B.**, DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J. Exp. Med*. 1999. **189**: 169-178.

2. **Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T.**, Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2001. **2**: 675-680.

3. **Alexander, J., del Guerico, MF., Frame, B., Maewal, A., Sette, A., Nahm, MH., and Newman, M.J.**, Development of experimental cabohydrate-conjugate vaccines composed of Streptococcus pneumaniae capsular polysaccharides and the universal helper T-lymphocyte epitope (PADRE). *Vaccine*. 2004. **22**: 2362-2367.

4. **Alexander, J., Fikes, J., Hoffman, S., Franke, E., Sacci, J., Apella, E., Chisari, F.V., Guidotti, L.G., Chesnut, R.W., Livingstone, B., and Sette, A.**, The optimization of helper T lymphocyte (HTL) function in vaccine development. *Immunol. Res*. 1998. **18**: 79-92.

5. **Anton, L.C., Schubert, U., Bacik, I., Princiotta, M.F., Wearsch, P.A., Gibbs, J., Day, P.M., Realini, C., Rechsteiner, M.C., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W.**, Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J. Cell Biol.* 1999. **146**: 113-124.

6. **Arnold, S.D., Hanau, D., Spehner, D., Schmid, C., Rammensee, H.G., de la Salle, H., and Schild, H.**, Receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 1999. **162**: 3757-3760.

7. **Bauer, T., Weinberger, K., and Jilg, W.**, Variants of the major T cell epitopes within the hepatitis B surface antigen are not recognized by specific T helper cells of vaccinated individuals, *Hepatology* 2002. **35**: 445-465.

8. **Bergmann, K.F., Cote, P.J., Moriarty, A., and Gerin J.L.**, Hepatitis delta antigen: antigenic structure and humoral immune response. *J. Immunol* 1989. **143:** 3714–3721.

9. **Botzler, C., Li,G., Issels, R.D., and Multhoff, G.**, Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. *Cell Stress.Chaperones.* 1998. **3**: 6-11.

10. **Boyle, J.S., Brady, J.L., and Lew, A.M.**, Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature* 1998. **392**: 408-411.

11. **Brons, N.H., Blaich, A., Wiesmuller, K.H., Schneider, F., Jung, G., and Muller, C.P.**, Hierarchic T-cell help to non-linked B-cell epitopes. *Scand. J. Immunol*. 1996. **44**: 478-484.

12. **Casares N., Lasarte J.J., de Cerio A.L., Sarobe P., Ruiz M., Melero I., Prieto J., and Borras-Cuesta F.**, Immunization with a tumor-associated CTL epitope plus a tumor-related or unrelated Th1 helper peptide elicits protective CTL immunity. *Eur. J. Immunol*. 2001. **31**: 1780-1789.

13. **Casey, J.L.**, RNA editing in hepatitis delta virus genotype III requires a branched double-hairpin RNA structure. *J. Virol*. 2002. **76**: 7385-7397.

14. **Chang, F.L., Chen, P.J., Tu, S.J., Wang C.J., and Chen D.S.**, The large form of hepatitis δ antigen is crucial for assembly of hepatitis δ virus. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1991. **88:** 8490–8494.

15. **Chang, M.F., Sun, C.Y., Chen, C.J., and Chang S.C.**, Functional motifs of delta antigen essential for RNA binding and replication of hepatitis delta virus. *J. Virol* 1993. **67:** 2529–2536.

16. **Chao, M., Hsiehm S.Y., and Taylor, J.**, Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *J. Virol* 1990. **64:** 5066–5069.

17. **Cheng, W.F., Hung, C.F., Chai, C.Y., Hsu, K.F., He, L., Rice, C.M., Ling, M., and Wu, T.C.**, Enhancement of Sindbis Virus Self-Replicating RNA Vaccine Potency by Linkage of Mycobacterium tuberculosis Heat Shock Protein 70 Gene to an Antigen Gene. *J. Immunol.* 2001. **166**: 6218-6226.

18. **Cho, B.K., Palliser, D., Guillen, E., Wisniewski, J., Young, R.A., Chen, J., and Eisen, H.N.**, A proposed mechanism for the induction of cytotoxic T lymphocyte production by heat shock fusion proteins. *Immunity* 2000. **12**: 263-272.

19. **Corr, M., Lee, D.J., Carson, D.A., and Tighe,H.**, Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J. Exp. Med*. 1996. **184**:1555-1560.

20. **Davila, E., and Celis, E.**, Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity. *J .Immunol.* 2000. **165**: 539-547.

21. **Davis, H.L., Weeranta, R., Waldschmidt, T.J., Tygrett, L., Schorr, J., and Krieg, A.M.**, CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 1998. **160**: 870-876.

22. **Diener, T.O., and Pruisner, S.B.**, Viroids and prions. In: K. Maramorosch and J.J. McKelvey (Herausgeber), Subviral pathogens of plants and animals. *Orlando: Academic*, 1985. S. 3-18.

23. **Donnely, J.J., Liu, M.A., and Ulmer, J.B.**, Antigen presentation and DNA vaccines. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2000. **162**: 190-193.

24. **Engelhard, V.H.**, Strucutre of peptides associated with class I and II MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol*. 1994. **12**: 181-207.

25. **Feldweg, A.M., and Srivastava, P.K.**, Molecular heterogenity of tumor rejection antigen/heat shock protein GP96. *Int.J.Cancer* 1995. **63**: 310-314.

26. **Fiedler, M., Lu, M., Siegel, F., Whipple, J., and Roggendorf, M.**, Immunization of woodchucks (Marmota monax) with hepatitis delta virus DNA vaccine. *Vaccine* 2001. **19**: 4618-4626.

27. **Fiedler, M., and Roggendorf, M.**, Vaccination against hepatitis delta virus infection: studies in the woodchuck (Marmota monax) model. *Intervirology* 2001. **44**: 154-161.

28. **Germain, R.N., and Margulies, D.H.**, The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann. Rev. Immunol*. 1993. **11**: 403-450.

29. **Germain, R.N.**, Antigen processing and presentation. In: Paul, W.E. (Herausgeber) Fundamental Immunology. *Lippincott-Raven, Philadelphia*. New York 1999. S. 287-341**.**

30. **Glenn, J.S., Watson, J.A., Havel, C.M., and White, J.M.**, Identification of prenylation site in delta virus large antigen. *Science* 1992. **256**: 1331-1333.

31. **Guidotti, L-G., and Chisari, F.V.**, Cytokine-induces viral purging-role in viral pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol*. 1999. **2**: 388-391.

32. **Guilhot, S., Huang, S.N., Xia, Y.P., La Monica, N., Lai, M.M.C., and Chisari, F.V.**, Expression of hepatitis delta virus large and small antigens in transgenic mice. *J. Virol*. 1994. **68:** 1052–1058.

33. **Gurunathan, S., Klinman, D.M., and Seder, R.A.**, DNA vaccines: immunology, application and optimization. *Annu. Rev. Immunol*. 2000. **18**: 927-974.

34. **Harding, C.V., and Geuze, H.J.**, Antigen processing and intracellular traffic of antigens and MHC molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993. **5**: 596-605.

35. **Huang, Y.H., Wu, J.C., Hsu, S.C., and Syu, W.J.**, Varied immunity generated in mice by DNA vaccines with large and small hepatitis delta antigens. *J. Virol.* 2003. **77**: 12980-12985.

36. **Huang, Y.H., Wu, J.C., Tao, M.H., Syu, W.J., Hsu, S.C., Chi, W.K., Chang, F.Y., and Lee, S.D.**, DNA-Based immunization produces Th1 immune responses to hepatitis delta virus in a mouse model. *Hepatology* 2000. **32**: 104-110.

37. **Hwang, S.B., and Lai, M.M.C.**, A unique conformation at the carboxyl terminus of the small hepatitis delta antigen revealed by specific monoclonal antibody. *Virology* 1993. **193**: 924–931.

38. **Janeway C.A., Travers P., Walport M., and Shlomchik M.**, The Humoral Immune Response, In: Janeway C.A., Travers P., Walport M., and Shlomchik M. (Herausgeber), Immunobiology. The Immune System in Health and Disease, 5th ed, Garland Science New York, S. 370-371.

39. **Jones, T.R., Obaldia, N., Gramzinski, R.A., Charoenvit, Y., Kolodny, N., Kitov, S., Davis, H.L., Krieg, A.M., and Hoffman, S.L.**, Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys. *Vaccine* 1999. **17**: 3065-3071.

40. **Karayiannis, P., Saldanha, J., Monjardino, J., Goldin R., Main J., Luther S., Easton M., Ponzetto A., and Thomas H.C.**, Immunization of woodchucks with recombinant hepatitis delta antigen does not protect against hepatitis delta virus infection. *Hepatology* 1990. **12:** 1125–1128.

41. **Kawakami, N., Sakane, N., Nishizawa, F., Iwao, M., Fukada, S.I., Tsujikawa, K., Kohama, Y., Ikawa, M., Okabe, M., and Yamamoto, H.**, Green fluorescent protein-transgenic mice: immune functions and their application to studies of lymphocyte development. *Immunol. Lett.* 1999. **70**: 165-171.

42. **Kim, J.J., Ayyavoo, V., Bagarazzi, M.L., Chattergoon, M.A., Dang, K., Wang, B., Boyer, J.D., and Weiner, D.B.**, In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J. Immunol.* 1997. **158**: 816-826.

43. **Kim, J.J., Trivedi ,N.N., Nottingham, L.K., Morrison, L., Tsai, A., Hu, Y., Mahalingam, S., Dang, K., Ahn, L., Doyle, N.K., Wilson, D.M., Chattergoon, M.A., Chalian, A.A., Boyer, J.D., Agadjanyan, M.G., and Weiner, D.B.**, Modulation of amplitude and direction of *in vivo* immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. *Eur. J. Immunol.* 1998. **28**: 1089-1103.

44. **Kim, T.S., DeKruyff, R.H., Rupper, R., Maecker, H.T., Levy, S., and Umetsu, D.T.**, An ovalbumin-IL12 fusion protein is more effective than ovalbumin plus free recombinant IL-12 in inducing a T helper cell type 1-dominated immune response and inhibiting antigen-specific IgE production. *J. immunol*. 1997. **158**: 4137-4144.

45. Klinman, D.M., Barnhart, K.M., and Conover, J., CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine* 1999. **17**: 19-25.

46. Kontgen, F., Suss, G., Stewart, C., Steinmetz, M., and Bluethmann, H., Targeted disruption of the MHC class II Aα gene in C57BL/6 mice. *Int. Immunol.* 1993. **5**: 957-964.

47. Krieg, A.M., CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu. Rev. *Immunol*. 2002. **20**: 709-760.

48. Krieg, A.M., Wu, T., Weeratna, R., Efler, S.M., Love, H.L., Yang, L., Yi, A.K., Short, D., and Davis, H.L., Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1998. **95**: 12631-12636.

49. Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., and Klinman, D.M., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995. **374**: 546-549.

50. Kuo, M.Y.P., Goldberg, J., Coates, L., Mason W., Gerin J., and Taylor J., Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure and applications. *J. Virol* 1988. **62:** 1855-1861.

51. Lai, M.M.C., The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annu Rev Biochem* 1995. **64:** 259-286.

52. Lakey, E.K., Margoliash, E., and Pierce, S.K., Identification of a peptide-binding protein having a role in antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987. **84**: 1659-1663.

53. Lazinski, D., and Grzadzielska, E., Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif. *Cell* 1989. **59:** 207-218.

54. Li, W.M., Bally, M.B., and Schutze-Redelmeier, M.P., Enhanced immune response to T-independent antigen by using CpG oligodeoxynucleotides encapsulated in liposomes. *Vaccine* 2001. **20**: 148-157.

55. Lin, H.P., Hsu, S.C., Wu, J.C., Sheen, I.J., Yan, B.S., and Syu, W.J., Localization of isoprenylated antigen of hepatitis delta virus by anti-farnesyl antibodies. *J. Gen. Virol*. 1999. **80**: 91-96.

56. Lindquist, S., The heat shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 1986. **55**: 1151-1191.

57. Liu, D.W., Tsao, Y.P., Kung, J.T., Ding, Y.A., Sytwu, H.K., Xiao, X., and Chen, S.L., Recombinant adeno-associated virus expressing human papillomavirus type 16 E7 peptide DNA fused with heat shock protein DNA as a potential vaccine for cervical cancer. *J. Virol.* 2000. **74**: 2888-2894.

58. Maecker, H.T., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., and Levy, S., DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune reponse to ovalbumin. *Vaccine* 1997. **15**: 1687-1696.

59. Mahvi, D.M., Burkholder, J.K., Turner, J., Culp, J., Malter, J.S., Sondel, P.M., and Yang, N.S., Particle-mediated gene transfer of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cDNA to tumor cells: implications for a clinically relevant tumor vaccine. *Hum. Gene Ther.* 1996. **7**: 1535-1543.

60. Makino, S., Chang, M.F., Shieh, C.K., Kamahora T., Vannier D.M., Govindarajan S., and Lai M.M., Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta virus RNA. *Nature* 1987. **329:** 343-346.

61. Mauch, C., Grimm, C., Meckel, S., Wands, J.R., Blum, H.E., Roggendorf, M., and Geissler, M., Induction of cytotoxic T lymphocyte responses against hepatitis delta virus antigens which protect against tumor formation in mice. *Vaccine* 2001. **20**:170-180.

62. Michalek, M.T., Benacerraf, B., and Rock, K.L., The class II MHC-restricted presentation of endogenously synthesized ovalbumin displays clonal variation, requires endosomal/lysosomal processing, and is upregulated by heat shock. *J. Immunol.* 1992. **148**: 1016-1024.

63. Milich, D.R., McLachlan, A., Thornton, G.B., and Hughes, J.L., Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. *Nature* 1987. **329**: 547-549.

64. Monaco, J.J., A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol. Today* 1992. **13**: 173-179.

65. More, S., Breloer, M., Fleischer, B., and Bonin, A., Activation of cytotoxic T cells in vitro by recombinant gp96 fusion proteins irrespective of the "fused" antigenic peptid sequence. *Immunol. Lett.* 1999. **69**: 275-282.

66. Moss, R.B., Diveley, J., Jensen, F., and Carlo, D.J., In vitro immune function after vaccination with an inactivated, gp120-depleted HIV-1 antigen with immunostimulatory oligodeoxynucleotides. *Vaccine* 2000. **18**: 1081-1087.

67. Neefjes, J.J., and Momburg, F., Cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 1993. **5**: 27-34.

68. Niebling, W.L., and Pierce, S.K., Antigen entry into early endosomes is insufficient for MHC class II processing. *J. Immunol.* 1993. **150**: 2687-2697.

69. Nisini, R., Paroli, M., Accapezzato, D., Bonino F., Rosina F., Santantonio T., Sallusto F., Amoroso A., Houghton M., and Barnaba V., Human $CD4^+$ T-cell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles. *J. Virol* 1997. **71:** 2241-2251.

70. Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y., 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*. 1997. **407**: 313-319.

71. Okada, E., Sasaki, S., Ishii, N., Aoki, I., Yasuda, T., Nishioka, K., Fukushima, J., Miyazaki, J., Wahren, B., and Okuda, K., Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens. *J. Immunol.* 1997. **159**: 3638-3647.

72. Oxenius, A., Martinic, M.M., Hengartner, H., and Klenerman, P., CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines. *J. Virol.* 1999. **73**: 4120-4126.

73. Partidos, C.D., Obeid, O.E., and Steward, M.W., Antibody responses to non-immuniogenic synthetic peptides induced by co-immunization with immunogenic peptides. *Immunology*. 1992 **77:** 262-266.

74. Paul, A.G., van Kooten, P.J., van Eden, W., and van der Zee, R., Highly autoproliferative T cells specific for 60-kDa heat shock protein produce IL-4/IL-10 and IFN-α and are protective in adjuvant arthritis. *J. Immunol.* 2000. **165**: 7270-7277.

75. Pepin, E., Villiers, C.L., Gabert, F.M., Serra, V.A., Marche, P.N., and Colomb, M.G., Heat shock increases antigenic peptide generation but decreases antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* 1996. **26**: 2939-2943.

76. Poisson, F., Baillou, A., Dubois, F., Janvier B., Roingeard P., and Goudeau A., Immune response to synthetic peptides of hepatitis delta antigen. *J. Clin Microbiol* 1993. **31:** 2343-2349.

77. Poisson, F., Roingeard, P., Baillou, A., Dubois F., Bonelli F., Calogero R.A., and Goudeau A., Characterization of RNA-binding domains of hepatitis delta antigen. *J. Gen Virol* 1993. **74:** 2473-2478.

78. Poisson, F., Roingeard, P., and Goudeau, A., Direct investigation of protein RNA-binding domains using digoxigenin-labeled RNAs and synthetic peptides: application to the hepatitis delta antigen. *J. Virol. Methods*. 1995. **55:** 381-389.

79. Polo, J.M., Lim, B., Govindarajan, S., and Lai, M.M.C., Replication of hepatitis delta virus RNA in mice after intramuscular injection of plasmid DNA. *J. Virol***.** 1995. **69**: 5203-5207.

80. Porgador, A., Irvine, K.R., Iwasaki, A., Barber, B.H., Restifo, N.P., and Germain, R.N., Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to $CD8^+$ T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med.* 1998. **188**: 1075-1082.

81. Rammensee, H.G., Falk, K., and Rötzschke, O., Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 1993. **11**: 213-244.

82. Re F., Srinivasan R., Igarashi T., Marincola F., and Childs R., Green fluorescent protein expression in dendritic cells enhances their immunogenicity and elicits specific cytotoxic T-cell responses in humans. *Exp Hematol.* 2004 **32:** 210-217.

83. Riedl, P., El Kholy, S., Reimann, J., and Schirmbeck, R., Priming biologically active antibody responses against an isolated, conformational viral epitope by DNA vaccination. *J.Immunol*. 2002. **169**: 1251-1260.

84. Riedl, P., Stober, D., Oehninger, C., Melber, K., Reimann, J., and Schirmbeck, R., Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J. Immunol*. 2002**.** **168**: 4951-4959.

85. Roman, M., Martin, O.E., Goodman, J.S., Nguyen, M.D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R.S., Richman, D.D., Carson, D.A., and Raz, E., Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat.Med.* 1997. **3**: 849-854.

86. Sarobe, P, Lasarte, J.J., Golvano, J., Gullon, A., Civeira, M.P., and Prieto, J., Induction of antibodies against a peptide hapten does not require covalent linkage between the hapten and a class II presentable T helper peptide. *Eur. J. Immunol*. 1991 **21**:1555-1558.

87. Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.D., Silverman, G.J., Lotz, M., Carson, D.A., Raz, E., and Nguyen, M.D., Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 1996. **273**: 352-354.

88. Schirmbeck, R., Böhm, W., and Reimann, J., Stress protein (hsp73)-mediated, TAP-independent processing of endogenous, truncated SV40 large T antigen for Db-restricted peptide presentation. *Eur .J. Immunol.* 1997. **27**: 2016-2023.

89. Schirmbeck, R., Gerstner, O., and Reimann, J., Truncated or chimeric endogenous protein antigens gain immunogenicity for B cells by stress protein-facilitated expression. *Eur. J. Immunol.* 1999. **29**: 1740-1749.

90. Schirmbeck, R., Kwissa, M., Fissolo, N., Elkholy, S., Riedl, P., and Reimann, J., Priming polyvalent immunity by DNA vaccines expressing chimeric antigens with a stress protein-capturing, viral J-domain. *FASEB J*. 2002. **16:** 1108-1110.

91. Schirmbeck, R., Melber, K., Kuhröber, A., Janowicz, Z.A., and Reimann, J., Immunization with soluble hepatitis B virus surface (S) protein particles elicits murine H-2 class I-restricted $CD8^+$ cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J. Immunol.* 1994. **152**: 1110-1119.

92. Schirmbeck, R., Wild, J., and Reimann, J., Similar as well as distinct MHC-I-binding peptides are generated by exogenous and endogenous processing of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) . *Eur. J. Immunol.* 1998. **28**: 4149-4161.

93. Sharma, A.K., and Khuller, G.K., DNA vaccines: Future strategies and relevance to intracellular pathogens. *Immunol. Cell Biol*. 2001. **79**: 537-546.

94. Shaw, D.M., Stanley, C.M., Partidos, C.D., and Steward M.W., Influence of the T-helper epitope on the titre and affinity of antibodies to B-cell epitopes after co-immunization, *Mol. Immunol*. 1993 **30**: 961-968.

95. Sin, J.I., Kim, J.J., Arnold, R.L., Shroff, K.E., McCallus, D., Pachuk, C., McElhiney, S.P., Wolf, M.W., Pompa-de, B.S., Higgins, T.J., Ciccarelli, R.B., and Weiner, D.B., IL-12 gene as a DNA vaccine adjuvant in a herpes mouse model: IL-12 enhances Th1-type CD4+ T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus-2 challenge. *J. Immunol.* 1999. **162**: 2912-2921.

96. Singh, J.H., Toes, R.E., Spee, P., Munz, C., Hilf, N., Schoenberger, S.P., Ricciardi, C.P., Neefjes, J., Rammensee, H.G., Arnold, S.D., and Schild, H., Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J. Exp. Med.* 2000. **191**: 1965-1974.

97. Sondermann, H., Becker, T., Mayhew, M., Wieland, F., and Hartl, F.U., Characterization of a receptor for heat shock protein 70 on macrophages and monocytes. *Biol. Chem.* 2000. **381**: 1165-1174.

98. Spies, T., Bresnahan, M., Bahram, S., Arnold, D., Blanck, G., Mellins, E., Pious, D., and DeMars, R., A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 1990. **348**: 744-747.

99. Steitz J., Bruck J., Gambotto A., Knop J., and Tuting T., Genetic immunization with a melanocytic self-antigen linked to foreign helper sequences breaks tolerance and induces autoimmunity and tumor immunity**.** *Gene Ther.* 2002. **9:** 208-213**.**

100. Suzue, K., Zhou, X., Eisen, H.N., and Young, R., Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. **94**: 13146-13151.

101. Tabona, P., Reddi, K., Khan, S., Nair, S.P., Crean, S.J., Meghji, S., Wilson, M., Preuss, M., Miller, A.D., Poole, S., Carne, S., and Henderson, B., Homogeneous Escherichia coli chaperonin 60 induces IL-1 and IL-6 gene expression in human monocytes by a mechanism independent of protein conformation. *J. Immunol.* 1998. **161**: 1414-1421.

102. Takeshita, F., Leifer, C.A., Gursel, I., Ishii, K.J., Takeshita, S., Gursel, M., and Klinman, D.M., Role of toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J. Immunol.* 2001. **167**: 3555-3558.

103. Todryk, S., Melcher, A.A., Hardwick, N., Linardakis, E., Bateman, A., Colombo, M.P., Stoppacciaro, A., and Vile, R.G., Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J. Immunol.* 1999. **163**: 1398-1408.

104. Townsend. A.R.M., and Bodmer, H.C., Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol*. 1989. **7**: 601-624.

105. Tulp, A., Verwoerd, D., Dobberstein, B., Ploegh, H.L., and Pieters, J., Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment [see comments]. *Nature* 1994. **369**: 120-126.

106. Udono, H., and Srivastava, P.K., Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J. Exp. Med.* 1993. **178**: 1391-1396.

107. Ulmer, J.B., Sadoff, J.C., and Liu, M.A., DNA vaccines. *Curr.Opin. Immunol*. 1996. **8**: 531-536.

108. Vabulas, R.M., Pircher, H., Lipford, G.B., Hacker, H., and Wagner, H., CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J. Immunol.* 2000. **164**: 2372-2378.

109. Wang, C.J., Chen, P.J., Wu, J.C., Patel D., and Chen D.S., Small-form hepatitis B surface antigen is sufficient to help in the assembly of hepatitis delta virus-like particles. *J. Virol* 1991. **65:** 6630-6636.

110. Wang, J.G., Jansen, R.W., Brown, E.A., and Lemon, S.M., Immunogenic domains of hepatitis delta virus antigen: peptide mapping of epitopes recognized by human and woodchuck antibodies. *J. Virol***.** 1990. **64**: 1108-1116.

111. Wang, J.G., and Lemon, S.M., Hepatitis delta virus antigen forms dimers and multimeric complexes *in vivo. J. Virol* 1993. **67:** 446-454.

112. Wang, K.S., Choo, Q.L., Weiner, A.J., Ou J.H., Najarian R.C., Thayer R.M., Mullenbach G.T., Denniston K.J., Gerin J.L., and Houghton M., Structure, sequence, and expression of the hepatitis delta viral genome. *Nature* 1986. **323:** 508-514.

113. Weeratna, R.D., McCluskie, M.J., Xu, Y., and Davis, H.L., CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine* 2000. **18**: 1755-1762.

114. Wild, J., Grusby, M.J., Schirmbeck, R., and Reimann, J., Priming MHC-I-restricted, cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is $CD4^+$ T cell-dependent. *J. Immunol.* 1999. **163**: 1880-1887.

115. Xia, Y.P., and Lai, M.M.C., Oligomerization of hepatitis delta antigen is required for both the *trans*-activating and *trans*-dominant inhibitory activities of the delta antigen. *J. Virol* 1992. **66:** 6641-6648.

116. Xiang, Z.Q. and Ertl, H.C.J., Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 1995. **2:** 129-135.

117. Yi, A.K., Chang, M., Peckham, D.W., Krieg, A.M., and Ashman, R.F., CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J. Immunol.* 1998. **160**: 5898-5906.

118. Zhang M., Ishii K., Hisaeda H., Murata S., Chiba T., Tanaka K., Li Y., Obata C., Furue M., and Himeno K., Ubiquitin-fusion degradation pathway plays an indispensable role in naked DNA vaccination with a chimeric gene encoding a syngeneic cytotoxic T lymphocyte epitope of melanocyte and green fluorescent protein. *Immunology*. 2004 **112**:567-574.

119. Zhou, X., Glas, R., Liu, T., Ljunggren, H.G., and Jondal, M., Antigen processing mutant T2 cells present viral antigen restricted through H-2Kb. *Eur. J. Immunol.* 1993. **23**: 1802-1808.

120. Zhou, X., Glas, R., Momburg, F., Hammerling, G.J., Jondal, M., and Ljunggren, H.G., TAP2-defective RMA-S cells present Sendai virus antigen to cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1993. **23**: 1796-1801.

7. ANHANG

Im Zusammenhang mit dieser Dissertation entstandene Veröffentlichungen:

Peter Seizer, Petra Riedl, Jörg Reimann und Reinhold Schirmbeck, Different sources of „help“ facilitate the antibody response to hepatitis D virus δ antigen. *J Mol Med.* 2005. **83(3)**: 225-234

Peter Seizer, Jörg Reimann, Reinhold Schirmbeck, Humoral immune response to hepatitis δ Antigen in a mouse model. *Universität Ulm GRK460 poster exhibition* 2003

Peter Seizer, Petra Riedl, Jörg Reimann und Reinhold Schirmbeck, Different sources of „help“ facilitate the antibody response to hepatitis D virus δ antigen. *Universität Ulm GRK460 poster exhibition* 2004

Alphabetische Auflistung der Chemikalien

Produkt	Hersteller	Kat.-Nr.
Acrylamid-Lösung/ Rotiphorese Gel 30	Roth	3029.1
Agar	Difco Laboratories	0140-01
Ampicillin	Merck	1.00278.0025
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva	13375
Beta-Mercaptoethanol	Biorad	161-0710
Bromphenolblau	Sigma	B-8026
BSA (Fraktion V) pH 7.0	Serva	11930
$CaCl_2$	Merck	1.02383.1000
CsCl	GibcoBRL	540-5507UB
Coomassie Brilliant Blue R 250 pure	Serva	17525
Diethanolamin	Fluka	31590
EDTA	Serva	11278
Essigsäure	Riedel-de Haen	33209
Ethanol	Merck	1.00983.2511
Ethanolamin	Merck	1.00845.1000
Gelatine	Merck	4078
Glycerin	J.T. Baker	7044
Glycin	Fluka	50049
Hefeextrakt	Difco	0127-07-1
HEPES	Serva	25245
H_2SO_4	Merck	1.00731.1000
Isopropanol	Merck	1.09634.2511
Leupeptin	Fluka	62070
LiCl	Roth	3739.2
Lysozym	Boehringer Mannheim	107255
Methanol	Merck	1.06009.2511
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	Fluka	63072
$Na_2B_4O_7$	Fluka	71998
NaCl	J.T. Baker	0278
Na_2CO_3	Merck	1.06392.1000
$NaHCO_3$	Merck	1.06329.1000
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	J.T. Baker	0326
NaN_3	Serva	30175
NH_4Cl	Merck	1.01142.1000
NP 40	Fluka	74385
Ovalbumin	Sigma	A-5503
Paraformaldehyd	Merck	4005
Poly I/C	Sigma	P-1530
Poly-L-Arginin	Sigma	P-7762
PPO 2,5-Diphenyl-oxazol	Fluka	43140
Rainbow [^{14}C] methylated	Amersham Pharmacia Biotech	CFA 756

Rainbow marker not labeled	Amersham Pharmacia Biotech	RPN 756
Saponin	Sigma	S-7900
SDS	Biorad	161-0301
Sucrose / Saccharose	Sigma	S-8501
Temed	Biorad	161-0801
Toluol	Roth	7115.1
Trasylol = Aprotinin	Bayer	48458
Triethanolamin	Merck	1.08379.1000
Tris	Sigma	T-1503
Triton-X 100	Fluka	93418
Trypton	Difco	0123-07-5
Tween 20	Fluka	93773

Dank

Ich bedanke mich bei allen Personen, ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle bei **Herrn Prof. Dr. Reinhold Schirmbeck**, dem Betreuer meiner Arbeit. Durch das Überlassen des Themas, seine fachliche und auch menschliche Unterstützung und durch seine ständige produktive Diskussionsbereitschaft trug er wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit bei.

Mein besonderer Dank gilt auch **Herrn Prof. Dr. Jörg Reimann** für das Überlassen des Themas, sein ständiges Interesse an den Ergebnissen und dem Fortschritt der Arbeit, seine fachliche Unterstützung und seine produktive Diskussionsbereitschaft.

Dr. Petra Riedl und **Dr. Nicolas Fissolo**, die zur gleichen Zeit ihre Dissertation anfertigten, hatten immer ein offenes Ohr für praktische und fachliche Fragen und unterstützten mich mit Rat und Tat. Hierfür und für ihre freundliche Art möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch **Tanja Güntert**, **Katja Ölberger** und **Claude Öhninger** für die großartige Hilfe im technischen Bereich und die äußerst positive Prägung des Arbeitsklimas.

Abschließend danke ich mich noch meiner Freundin **Judith Saup** und **meinen Eltern** für die menschliche und moralische Unterstützung während des Anfertigens der Arbeit.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Peter Seizer
geboren am 22.September 1978 in Ulm
ledig

Ausbildung

seit Sept. 2002	Doktorand am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Ulm unter der Anleitung von Prof. Dr. R. Schirmbeck
Sept. 2004	2. Staatsexamen
Sept. 2002	1. Staatsexamen
Sept. 2001	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
seit Okt.1999	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
1998 bis 1999	Zivildienst an der Heilpädagogischen Tagesstätte Senden
1989 bis 1998	St. Thomas-Gymnasium, Wettenhausen Allgemeine Hochschulreife

Besondere Auszeichnungen

2002	Aufnahme als Kollegiat in das Graduiertenkolleg der Universität Ulm
2002	Aufnahme als Stipendiat in das Cusanuswerk (Katholisches Begabtenförderungswerk)
2001	Aufnahme als Stipendiat bei e-fellows.net (privatwirtschaftliche Begabtenförderung)

Auslandsaufenthalte

April 2004	Praktikum am Imperial College London (GB)
Aug. 2003 bis Sept. 2003	Famulatur an der Infektionsklinik Malmö (S)