

Jomo Bernardin

Verstärkung der Immunantwort durch Co-Immunisierung mit Flt3-L in einem Hepatitis C Mausmodell

Geboren am 17.2.1976 in Saarbrücken

Reifeprüfung am 4.9.1995 in Port-au-Prince, Haiti

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1996 bis WS 2003

Physikum am 9.9.1998 an der Universität Heidelberg

Klinisches Jahr in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg und Bruchsal

3. Staatsexamen am 14.11.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. J. Encke

Infektionen durch das Hepatitis C Virus (HCV) erfahren eine globale Verbreitung und neigen häufig zu einem chronischen Verlauf. Die Bekämpfung der hepatotropen Viren durch unser Immunsystem führt zu einer Leberschädigung, die nicht selten in einer Leberzirrhose endet und ein beträchtlich höheres Risiko, ein Leberzellkarzinom zu entwickeln bedingt. Moderne Therapieansätze sind aufwendig, kostenintensiv und führen nur zu einem unzureichenden Erfolg. Versuche eine Vakzine zu entwickeln scheiterten an der Adaptationsfreudigkeit und an der genetischen Heterogenität des Agens, dass in seinem Wirt als eine Art Quasispezies, einer Mischung eng verwandter, aber dennoch distinkter Genome zirkuliert. In unserer Arbeit untersuchten wir anhand eines DNA-Vakzinierungsmodells die Fähigkeit des Liganden der Fms-Like Tyrosine Kinase 3 (Flt3-L) eine Immunität gegen ein relativ konserviertes Protein des HCV, das Nicht-Strukturprotein 5 (NS5), zu begünstigen. Es war gezeigt worden, dass Flt3-L die Expansion von funktionsfähigen Dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen induziert, die wiederum eine entscheidende Rolle bei der Viruselimination spielen sollen. Wir klonierten die zuvor identifizierte Sequenz für die lösliche Form des Flt3 Liganden in einen erprobten Expressionsvektor. Nach Transfektion von Huh-7 Hepatomzellen mit diesem Konstrukt konnte mittels Westernblot und ELISA die in vitro Expression des Liganden nachgewiesen werden. Die in vivo Experimente wurden in zwei Immunisierungsrunden aufgeteilt, erstere an BALB/c und letztere an C57BL/6 Mäusen, mit jeweils nach Gruppen aufgeteilten intramuskulären und subkutanen Injektionen eines HCV NS5-exprimierenden Vektors in verschiedenen Kombinationen mit Flt3-L, einem den bekannten Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) exprimierenden Vektor oder beider Co-Stimulatoren. Die Tiere wurden alle dreimal in zwei-wöchentlichen Abständen mit jeweils 100µg Plasmid-DNA immunisiert; 14 Tage nach der letzten Injektion wurden sie getötet, Serum und Milz wurden für weitere Untersuchungen entnommen. Im Gegensatz zu einigen

publizierten Daten, zeigte sich keine signifikante Erhöhung des Flt3-L Serumspiegels nach Vakzinierung. Anhand eines NS5 Antikörper ELISA konnte eine durch die Co-Stimulation deutlich gesteigerte humorale Antwort auf die durchgeführte DNA-Immunsierung erfasst werden, wobei aber die mit GM-CSF co-stimulierte Gruppe die stärkste Antikörperproduktion aufwies. Ein ähnliches Bild wurde in den Proliferationsassays mit den aus der Milz gewonnenen T-Lymphozyten beobachtet. Das wahre Potential des Flt3-L konnte dann in einem in vivo Tumormodell demonstriert werden. Zwei Wochen nach der letzten Immunsierung wurde den Versuchstieren ein Zellklon stabil HCV-NS5 exprimierender Mausmyelomzellen in die rechte Flanke gespritzt. Die Co-Immunsierung mit Flt3-L führte zu einer deutlichen Verlangsamung des Tumorwachstums und in 12% der Fälle zur Tumorfreiheit. Die kombinierte Gabe mit GM-CSF konnte diese Quote sogar auf 25% erhöhen, wobei alle nicht co-stimulierten Versuchstiere innerhalb von 4 Wochen an ihrer Geschwulst verstarben. Der tumorprotektive Effekt des Flt3-L war bisher nur anhand des rekombinanten Proteins untersucht worden. Wir demonstrierten in dieser Arbeit erstmals die Realisierbarkeit eines co-stimulatorischen DNA-Vakzinierungsansatzes.