

Genetische Immunisierung: neue Wege zu protektiven und therapeutischen Vakzinen gegen allergische Erkrankungen

Sandra Scheiblhofer, Richard Weiss und Josef Thalhamer

Christian-Doppler-Labor für Allergiediagnostik und Therapie, Fachbereich Molekulare Biologie, Universität Salzburg, Salzburg, Österreich

Eingegangen am 26. Juni 2006, angenommen am 28. Dezember 2006
© Springer-Verlag 2007

Genetic immunization: new ways for protective and therapeutic vaccines against allergic diseases

Summary. Gene vaccines have proven to be a powerful tool to induce anti-allergic immune responses. Their underlying functional principle is based on the recruitment of allergen-specific Th1 cells and the establishment of a Th1 cytokine milieu, which protects against the development of a Th2-biased response and balances an already ongoing Th2-type response. Genetic immunization also offers novel approaches to the major problems associated with protein immunization, such as crosslinking of pre-existing IgE on mast cells/basophils or induction of de novo synthesis of IgE by the protein immunization itself.

In addition to the description of the principles of gene vaccination, this review gives a short overview of recently developed anti-allergic gene vaccines with an optimized efficacy and safety profile.

Key words: Genetic immunization, DNA vaccine, type I allergy, Th1/Th2 immune response.

Zusammenfassung. Die genetische Immunisierung, oder auch DNA-Immunisierung genannt, hat sich im letzten Jahrzehnt als wirksame Methode zur Induktion von anti-allergischen Immunreaktionen im Tiermodell bewährt. Die Wirkung von DNA-Impfstoffen beruht auf der Rekrutierung von Allergen-spezifischen Th1- und CD8⁺-Zellen und dem Aufbau eines Th1-Zytokin-Milieus. Die Kombination beider Aspekte wirkt in einem protektiven Ansatz gegen die Entwicklung einer Th2-Immunreaktion und vermindert in einem therapeutischen Ansatz eine bereits bestehende allergische Reaktion.

Genetische Vakzine öffnen innovative Auswege aus den Problemen, die mit der Immunisierung durch Proteine verbunden sind. Es können sowohl das Kreuzvernetzen von bereits vorhandenen IgE-Antikörpern auf Mastzellen und Basophilen als auch die Induktion von neuen IgE-Antikörpern vermieden werden.

Neben der Beschreibung der Wirkungsweise der genetischen Immunisierung wird im vorliegenden Übersichtsartikel die Entwicklung von auf Sicherheit und Wirksamkeit optimierten DNA-Vakzinen zur Allergiebehandlung vorgestellt.

Schlüsselwörter: Genetische Immunisierung, DNA-Vakzine, Typ-I-Allergie, Th1/Th2-Immunreaktion.

Einleitung

Genetische Impfstoffe stellen die jüngste Generation von Vakzinen dar. Sie bestehen aus reiner RNA oder DNA und können wie herkömmliche Impfstoffe injiziert werden. Die von Zellen aufgenommene genetische Information wird transkribiert, translatiert und anschließend dem Immunsystem über MHC Klasse I- und/oder MHC Klasse II-Moleküle präsentiert. In zahlreichen experimentellen Studien konnte ihre prinzipielle Wirksamkeit und ihr breites Anwendungsspektrum gezeigt werden. Sie erwiesen sich als schützend in unterschiedlichsten Infektions- und Tumormodellen (siehe Übersichtsartikel [1–4]).

Ihre Eigenschaft, unter bestimmten Bedingungen starke Immunreaktionen vom Th1-Typus zu induzieren, machte sie zu interessanten Vakzinkandidaten für virale Infektionen und Krebserkrankungen. In den letzten Jahren erwies sich diese Eigenschaft jedoch auch als die Basis für die Entwicklung wirksamer anti-allergischer Impfstoffe [1].

Prinzipien der genetischen Immunisierung

Obwohl die genauen Mechanismen, die zur Auslösung einer Immunreaktion durch genetische Immunisierung führen, nicht vollständig aufgeklärt sind, ist die Wirkungsweise der Antigenprozessierung und Präsentation von immunkompetenten Zellen sehr gut bekannt.

Korrespondenz: Prof. Dr. Josef Thalhamer, Christian-Doppler-Labor für Allergiediagnostik und Therapie, Fachbereich Molekulare Biologie, Universität Salzburg, Hellbrunnerstrasse 34, 5020 Salzburg, Österreich.
Fax: ++43-662-80445751
E-Mail: Josef.Thalhamer@sbg.ac.at

Generell werden exogene Antigene im Kontext von MHC Klasse II-Molekülen präsentiert. Dazu werden die Proteine von den Zellen internalisiert und in endosomalen Kompartimenten in Peptide zerlegt. Ein Teil dieser Peptide, bevorzugt solche mit einer Länge von 12–20 Aminosäuren, wird in einem komplexen Vorgang mit MHC Klasse II Molekülen verbunden und an der Oberfläche der Zelle antigen-spezifischen CD4⁺-T-Zellen angeboten.

Im Gegensatz dazu erkennen CD8⁺-Lymphozyten einen Komplex von MHC Klasse-I-Molekülen mit Peptiden bestehend aus 8–12 Aminosäuren. Diese Peptide, typisch für die Präsentation auf MHC Klasse I-Molekülen, stammen bevorzugt von intrazellulären Proteinen. Nachdem letztere durch das Proteasom prozessiert wurden, werden die daraus resultierenden Peptide über einen Transportkomplex (transporter associated with antigen presentation – TAP) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) eingeschleust, mit dem MHC Klasse I-Molekül assoziiert und dann an die Zelloberfläche transportiert.

Es gibt jedoch Hinweise, dass dieser generelle Mechanismus von manchen Zellen des Immunsystems nicht so strikt gehandhabt wird. Unter bestimmten Umständen kann es in Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) zu einem vorteilhaften Informationsaustausch zwischen den beiden Präsentationswegen kommen, ein Vorgang, der „cross-priming“ genannt wird [5–8].

Diese hier kurz beschriebenen Vorgänge setzen allerdings die Initiation einer Immunreaktion voraus. Die Aktivierung von T-Zellen erfordert nämlich die Präsentation des Antigens durch APZ in einem speziellen Kontext. Bestimmte kostimulatorische Signale sind zur Aktivierung notwendig, ohne diese Signale können Anergie oder Apoptose die Folge sein [9]. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Dendriten eine zentrale Rolle in diesen Aktivierungsschritten spielen und auf eine Reihe von molekularen Gefahrensignalen („danger-signals“) wie Lipopolysaccharid (LPS) oder sogar bakterieller DNA reagieren [10–12].

Th1-Immunreaktion als Schlüssel zu genetischen Impfstoffen gegen Allergie

Typ I Allergie ist charakterisiert durch die Induktion von Th2-Immunreaktionen gegen harmlose Antigene aus Gräser- oder Baumpollen, Schimmelpilzen, Hausstaubmilben, Insekten, Haustieren und Nahrungsmitteln, um nur einige prominente Allergieauslöser zu nennen. Auf Grund von komplexen genetischen und durch die Umwelt definierten Faktoren machen Atopiker Immunreaktionen, die sich durch die Bildung von IgE-Antikörpern und die Produktion von Th2-Zytokinen wie Interleukin(IL)-4, IL-5 und IL-13 auszeichnen [13–16].

Die einzigartigen Eigenschaften von genetischen Impfstoffen, vor allem ihre Fähigkeit, Th1-Immunreaktionen zu induzieren, haben zur Entwicklung neuer Ansätze für protektive und therapeutische Vakzine gegen Typ-I-Allergien geführt. Die anti-allergischen Wirkungsprinzipien konnten eindeutig der Rekrutierung von Interferon-gamma(IFN-γ)-produzierenden CD4⁺- und CD8⁺-Zellen und dem Aufbau eines ausgeglichenen Th1/Th2-Zytokin-Milieus zugeschrieben werden. Weder blockierende Antikörper noch regulatorische T-Zellen oder ande-

re Toleranz-basierte Reaktionen, wie sie für die spezifische Immuntherapie (SIT) mit Protein-Allergenen angenommen werden, spielen in der genetischen Immunisierung gegen Allergie eine Rolle [17].

DNA ist Vakzin und gleichzeitig Adjuvans

Im Gegensatz zu Proteinvakzinen induzieren DNA-Vakzine nach intradermaler oder intramuskulärer Verabreichung Th1-Immunreaktionen. Eine Erklärung hierfür bietet die immunstimulatorische Eigenschaft von bestimmten DNA-Sequenzen. Nicht-methylierte bakterielle DNA, und hier besonders die sogenannten CpG-Motive, repräsentieren ein evolutionär altes Gefahrensignal für das Immunsystem von Säugetieren. Diese Motive lösen in APZ die Expression von unterschiedlichen Zytokinen wie IFN-α/β, TNF-α, IL-6 und IL-12 aus, letzteres veranlasst Natürliche Killerzellen (NK) und T-Zellen zur Produktion von IFN-γ und unterdrückt auf diese Weise Th2-Zelldifferenzierung [18]. Die CpG-Motive gehören zu den Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs) und aktivieren APZ über Mustererkennungs-Rezeptoren (pattern recognition receptors – PRR), wie die Toll-like Rezeptoren (TLR – siehe Übersichtsartikel [19, 20]).

Jüngste Publikationen weisen jedoch darauf hin, dass die TLR-vermittelten Signale nicht die einzigen Auslöser der Immunogenität und/oder der Th1 Induktion von DNA-Vakzinen sind [21, 22].

Erste Studien zur genetischen Immunisierung gegen Allergie

Mit einem Modellmolekül (β-Galaktosidase von *Escherichia coli*) konnte 1996 erstmals gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit Plasmid-DNA, die für dieses Molekül kodiert, zu einer schützenden Th1-Immunreaktion führt [23]. Im gleichen Jahr wurde die anti-allergische Wirkung von DNA-Vakzinen auch für ein natürliches Allergen, das Milbenallergen Der p 5, bewiesen [24, 25].

In den darauf folgenden Jahren wurden DNA-Vakzine gegen eine Reihe von Modellmolekülen und klinisch relevanten Allergenen entwickelt [26–32]. Zu den diesbezüglich am besten untersuchten Allergenen gehört das Hauptallergen der Birkenpollen, Bet v 1, gegen das 1999 erstmals genetisch immunisiert wurde [17, 33–36]. Zusammenfassend zeigten die Arbeiten, dass DNA-Immunisierung mit Allergen-kodierender Plasmid DNA eine Antigen-spezifische Th1-Immunreaktion induziert, die die allergische Sensibilisierung (Induktion von IgE-Antikörpern) verhindert und eine bereits aufgebaute allergische Reaktion verringert, indem sie IgE-Produktion hemmt, IgE-abhängige Mediatorausschüttung vermindert und anaphylaktische Reaktionen reduziert. Darüber hinaus verringerte genetische Immunisierung in Antigen-spezifischer Weise auch die Freisetzung von Histamin und IL-5, sowie Eosinophilie in Lungenlavagen und reduzierte die Atemwegs-Hyperreaktivität nach Provokation mit Metacholin.

Optimierte DNA Vakzine für protektive und therapeutische Allergiebehandlung

Ähnlich wie in der Proteinimmunisierung bestimmen hauptsächlich zwei Parameter die Immunogenität eines DNA-Vakzins: die Natur des Antigens und die stimulatorischen Signale während der Antigen-Verabreichung. Hinzu kommen bei den genetischen Impfstoffen noch der Einfluss der Genexpression innerhalb der transfizierten Zellen, die Art der Antigen-Präsentation, die Methode der Vakzin-Applikation und die inhärenten adjuvanten Eigenschaften des DNA-Vakzins.

Da für DNA-Vakzine gegen Allergene, und hier vor allem gegen Pollenallergene, pflanzliche Gene verwendet werden, ist ein erster notwendiger Optimierungsschritt immer die Rekodierung der Gene für den Kodon-Gebrauch (codon usage) im Säuger. Dies ist deshalb notwendig, da viele Kodons von Pflanzengenen im Säuger suboptimal sind und daher eine drastische Reduktion der Expression des kodierten Allergens zur Folge hätten.

Am Beispiel von Art v 1, dem Hauptallergen aus Beifuß, konnten wir zeigen, dass die Wildtypform des Gens zu keiner Immunreaktion führt. Die Analyse der Sequenz ergab eine stark unterschiedliche Kodierung zwischen der Pflanze und dem Säugersystem. Die Rekodierung führte zu einer 180-fachen Steigerung der Expressionsrate und damit auch zur Immunogenität des DNA-Vakzins [37].

Abgesehen von der Notwendigkeit einer starken Immunogenität, zumindest der zellulären Schiene der Immunreaktion, steht vor allem die Sicherheit der Allergie DNA-Vakzine im Zentrum der Forschungsanstrengungen. Zwei Aspekte sind hier besonders zu berücksichtigen: 1. Die Dosis der genetischen Vakzine sollte so gering wie möglich sein, um die Einbringung von großen Mengen an fremder DNA in den Organismus zu vermeiden. 2. Das vom DNA-Vakzin translatierte Genprodukt sollte keine anaphylaktischen Nebenreaktionen, wie sie von der konventionellen SIT bekannt sind, auslösen. Dies bedingt die Entwicklung von hoch-immunogenen, niedrig dosierbaren hypoallergen genetischen Vakzinen.

In jüngsten Arbeiten aus unserem Labor konnten neue Impfstoffe entwickelt werden, die beide Bedingungen erfüllen. Das Dosisproblem wurde mit sogenannten Replikon DNA-Vakzinen gelöst, eine Routineproduktion für hypoallergene DNA-Vakzine gelang mittels erzwungener Ubiquitinierung.

Replikon DNA-Vakzine basieren auf Eigenschaften von Alphaviren wie Sindbis- oder Semliki Forest-Virus. Das Genom dieser Viren kodiert für ein Replikase-Enzym, das vom Virus zur effizienten Vermehrung des Genoms verwendet wird. Theoretisch sollte ein Molekül selbst-replizierende RNA pro Zelle genügen, um genügend Antigen für die Induktion einer Immunreaktion zu produzieren. Die Antigenproduktion in mit solcher RNA-transfizierten Zellen ist in der Tat unabhängig von der RNA-Menge [38]. Die Stabilität von RNA-Vakzinen stellt jedoch ein Problem dar, wir haben deshalb die Sequenz der selbst-replizierenden RNA-Moleküle revers in ein konventionelles DNA-Vakzin kloniert. Im Falle des Modellallergens β -Galaktosidase und des Gräserpollenallergens Phl p 5 war die intradermale Injektion von Nanogramm-Mengen dieses Vakzintyps ausreichend, um eine

anti-allergische Th1-Reaktion auszulösen. Damit konnte die wirksame Dosis um das 20.000-fache gesenkt werden [39, 40].

Zur Ausschaltung jeglichen Risikos von anaphylaktischen Reaktionen entwickelten wir eine Methode der „erzwungenen“ Ubiquitinierung. Dabei werden die durch das DNA-Vakzin kodierten Proteine im Proteasom degradiert und somit die dreidimensionale Struktur des Allergens zerstört – ein Konzept, das ursprünglich für die Induktion von zytotoxischen Immunreaktionen verwendet wurde [41, 42]. Der Verlust von IgE-Epitopen ist eine wesentliche Voraussetzung für Hypoallergenizität eines Vakzins, da im allergischen Organismus prä-existierende IgE-Antikörper auf Mastzellen durch Quervernetzung über native Allergene Anaphylaxie auslösen können.

Die Ergebnisse unserer Studien zeigten, dass, wie postuliert, auf Grund der fehlenden nativen Strukturen keine Antikörper gebildet wurden, jedoch die zelluläre Immunreaktion nicht beeinträchtigt wurde. Diese war vom gewünschten Th1-Typus und schützte vor der allergischen Sensibilisierung durch rekombinantes Allergen, reduzierte die Eosinophilie der Atemwege sowie die Becherzell-Hyperplasie und die Inflammation des Lungenendothels. Darüber hinaus bewies das Vakzin signifikante Wirksamkeit in einem therapeutischen Ansatz [43].

Zusammenfassend können wir feststellen, dass die besonderen Eigenschaften von DNA-Impfstoffen, und hier vor allem ihre inhärente Th1-Immunogenität, sie zu attraktiven Kandidaten für anti-allergische Impfstoffe macht. Darüber hinaus ermöglicht die genetische Immunisierung durch gezieltes molekulares Design des translatierten Antigens und durch gesteuerte Immunmodulation die Produktion von hypoallergen Vakzinen mit hohem Sicherheitsprofil bei drastisch reduzierter Impfstoffdosis. Die eindrucksvollen anti-allergischen Effekte von DNA-Vakzinen im Tiermodell und der dringende Bedarf nach einer verbesserten Allergiebehandlung, basierend auf molekularer Diagnose und Therapie, rechtfertigen die Planung und Durchführung von klinischen Studien mit genetischen Vakzinen gegen allergische Erkrankungen in der nahen Zukunft.

Literatur

1. Leitner WW, Thalhamer J (2003) DNA vaccines for non-infectious diseases: new treatments for tumour and allergy. *Expert Opin Biol Ther* 3: 627–638
2. Apostolopoulos V, Plebanski M (2000) The evolution of DNA vaccines. *Curr Opin Mol Ther* 2: 441–447
3. Liu MA (2003) DNA vaccines: a review. *J Intern Med* 253: 402–410
4. Sharma AK, Khuller GK (2001) DNA vaccines: future strategies and relevance to intracellular pathogens. *Immunol Cell Biol* 79: 537–546
5. Lu Z, Yuan L, Zhou X, Sotomayor E, Levitsky HI, Pardoll DM (2000) CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 191: 541–550
6. Heath WR, Carbone FR (1999) Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. *Curr Opin Immunol* 11: 314–318
7. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P (1998) A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+

- T-helper and a T-killer cell [see comments]. *Nature* 393: 474–478
8. Kumaraguru U, Rouse RJD, Nair SK, Bruce BD, Rouse BT (2000) Involvement of an ATP-dependent peptide chaperone in cross-presentation after DNA immunization. *J Immunol* 165: 750–759
 9. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB (1995) CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3: 87–98
 10. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9: 10–16
 11. Steinman RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271–296
 12. Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991–1045
 13. Kay AB (1997) *Allergy and Allergic Diseases*. Blackwell Science, Oxford, UK
 14. Wills-Karp M, Santeliz J, Karp L (2001) The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nature Reviews Immunol* 1: 69–75
 15. Niederberger V, Niggemann B, Kraft D, Spitzauer S, Valenta R (2002) Evolution of IgM, IgE and IgG(1–4) antibody responses in early childhood monitored with recombinant allergen components: implications for class switch mechanisms. *Eur J Immunol* 32: 576–584
 16. Herz U, Ahrens B, Scheffold A, Joachim R, Radbruch A, Renz H (2000) Impact of in utero Th2 immunity on T cell deviation and subsequent immediate-type hypersensitivity in the neonate. *Eur J Immunol* 30: 714–718
 17. Hochreiter R, Stepanoska T, Ferreira F, Valenta R, Vrtala S, Thalhamer J, Hartl A (2003) Prevention of allergen-specific IgE production and suppression of an established Th2-type response by immunization with DNA encoding hypoallergenic allergen derivatives of Bet v 1, the major birch-pollen allergen. *Eur J Immunol* 33: 1667–1676
 18. Cowdery JS, Chace JH, Yi AK, Krieg AM (1996) Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN- γ in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* 156: 4570–4575
 19. Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335–376
 20. Krieg AM (2000) The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 12: 35–43
 21. Babiuk S, Mookherjee N, Pontarollo R, Griebel P, van Drunen Littel-van den Hurk S, Hecker R, Babiuk L (2004) TLR9 $^{-/-}$ and TLR9 $^{+/+}$ mice display similar immune responses to a DNA vaccine. *Immunology* 113: 114–120
 22. Spies B, Hochrein H, Vabulas M, Huster K, Busch DH, Schmitz F, Heit A, Wagner H (2003) Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice. *J Immunol* 171: 5908–5912
 23. Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roman M, Swain SL, Spiegelberg HL, Carson DA (1996) Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5141–5145
 24. Hsu CH, Chua KY, Tao MH, Lai YL, Wu HD, Huang SK, Hsieh KH (1996) Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization [see comments]. *Nat Med* 2: 540–544
 25. Hsu CH, Chua KY, Tao MH, Huang SK, Hsieh KH (1996) Inhibition of specific IgE response in vivo by allergen-gene transfer. *Int Immunol* 8: 1405–1411
 26. Jacquet A, Magi M, Haumont M, Jurado M, Garcia L, Bollen A (2003) Absence of immunoglobulin E synthesis and airway eosinophilia by vaccination with plasmid DNA encoding ProDer p 1. *Clin Exp Allergy* 33: 218–225
 27. Kwon SS, Kim N, Yoo TJ (2001) The effect of vaccination with DNA encoding murine T-cell epitopes on the Der p 1 and 2 induced immunoglobulin E synthesis. *Allergy* 56: 741–748
 28. Huangfu T, Lim LH, Chua KY (2005) Efficacy evaluation of Der p 1 DNA vaccine for allergic asthma in an experimental mouse model. *Vaccine* 24: 4576–4581
 29. Wolfowicz CB, Huangfu T, Chua KY (2003) Expression and immunogenicity of the major house dust mite allergen Der p 1 following DNA immunization. *Vaccine* 21: 1195–1204
 30. Jarman ER, Lamb JR (2004) Reversal of established CD4 $^{+}$ type 2 T helper-mediated allergic airway inflammation and eosinophilia by therapeutic treatment with DNA vaccines limits progression towards chronic inflammation and remodelling. *Immunology* 112: 631–642
 31. Peng HJ, Su SN, Chang ZN, Chao PL, Kuo SW, Tsai LC (2002) Induction of specific Th1 responses and suppression of IgE antibody formation by vaccination with plasmid DNA encoding Der f 11. *Vaccine* 20: 1761–1768
 32. Adel-Patient K, Creminon C, Boquet D, Wal JM, Chatal JM (2001) Genetic immunisation with bovine beta-lactoglobulin cDNA induces a preventive and persistent inhibition of specific anti-BLG IgE response in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 126: 59–67
 33. Hartl A, Kiesslich J, Weiss R, Bernhaupt A, Mostböck S, Scheibelhofer S, Flockner H, Sippl M, Ebner C, Ferreira F, Thalhamer J (1999) Isoforms of the major allergen of birch pollen induce different immune responses after genetic immunization. *Int Arch Allergy Immunol* 120: 17–29
 34. Hartl A, Kiesslich J, Weiss R, Bernhaupt A, Mostböck S, Scheibelhofer S, Ebner C, Ferreira F, Thalhamer J (1999) Immune responses after immunization with plasmid DNA encoding Bet v 1, the major allergen of birch pollen. *J Allergy Clin Immunol* 103: 107–113
 35. Hartl A, Hochreiter R, Stepanoska T, Ferreira F, Thalhamer J (2004) Characterization of the protective and therapeutic efficiency of a DNA vaccine encoding the major birch pollen allergen Bet v 1a. *Allergy* 59: 65–73
 36. Hochreiter R, Hartl A, Freund J, Valenta R, Ferreira F, Thalhamer J (2001) The influence of CpG motifs on a protein or DNA-based Th2-type immune response against major pollen allergens Bet v 1a, Phl p 2 and *Escherichia coli*-derived beta-galactosidase. *Int Arch Allergy Immunol* 124: 406–410
 37. Bauer R, Himly M, Dedic A, Ferreira F, Thalhamer J, Hartl A (2003) Optimization of codon usage is required for effective genetic immunization against Art v 1, the major allergen of mugwort pollen. *Allergy* 58: 1003–1010
 38. Leitner WW, Ying H, Driver DA, Dubensky TW, Restifo NP (2000) Enhancement of tumor-specific immune response with plasmid DNA replicon vectors. *Cancer Res* 60: 51–55
 39. Scheibelhofer S, Gabler M, Leitner WW, Bauer R, Zoegg T, Ferreira F, Thalhamer J, Weiss R (2006) Inhibition of type I allergic responses with nanogram doses of replicon-based DNA vaccines. *Allergy* 61: 828–835

40. Gabler M, Scheiblhofer S, Kern K, Leitner WW, Stoecklinger A, Hauser-Kronberger C, Alinger B, Lechner B, Prinz M, Vrtala S, Valenta R, Thalhamer J, Weiss R (2006) Immunization with a low-dose replicon DNA vaccine encoding Phl p 5 effectively prevents from allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 118: 734–741
41. Rodriguez F, Zhang J, Whitton JL (1997) DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol* 71: 8497–8503
42. Wu Y, Kipps TJ (1997) Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasome-dependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes. *J Immunol* 159: 6037–6043
43. Bauer R, Scheiblhofer S, Kern K, Gruber C, Stepanoska T, Thalhamer T, Hauser-Kronberger C, Alinger B, Zoegg T, Gabler M, Ferreira F, Hartl A, Thalhamer J, Weiss R (2006) Generation of hypoallergenic DNA vaccines by forced ubiquitination: Preventive and therapeutic effects in a mouse model of allergy. *J Allergy Clin Immunol* 118: 269–276