

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN 0378-1119	2. Berichtsart Abschlußbericht
3a. Titel des Berichts Rekombinante attenuierte Salmonellen als Vektoren für die genetische Vakzinierung gegen Infektionskrankheiten und Krebs	
3b. Titel der Publikation Improvement of the T7 expression system by the use of T7 lysozyme	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Lößner, Holger; Spreng, Simone; Meyer, Thomas F.	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.11.2001
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n)) Spehr, Volker; Frahm, Dagmar; und Meyer, Thomas F.	6. Veröffentlichungsdatum 31.10.2000
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie Abteilung Molekular Biologie Schumannstraße 21/22 D-10117 Berlin	7. Form der Publikation Fachzeitschrift
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	9. Ber. Nr. Durchführende Institution -
	10. Förderkennzeichen *) 01 GE 9630/1
	11a. Seitenzahl Bericht 11
	11b. Seitenzahl Publikation 9
	12. Literaturangaben 43
	14. Tabellen 0
	15. Abbildungen 0
16. Zusätzliche Angaben -	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -	
18. Kurzfassung In diesem Projekt wurde auf der Basis attenuierter Salmonellenimpfstämme ein neuartiges DNA-Vektorsystem konstruiert und im Mausmodell evaluiert. Gegenüber dem herkömmlichen Carrierstamm ist unser spontan lytisches Vektorsystem in der Stimulation humoraler und zellulärer Immunantworten überlegen. Protektive Antigene beliebiger Herkunft sowie weitere Faktoren, z. B. Immunomodulatoren, können leicht in den Carrier integriert werden und für die genetische Vakzinierung gegen Infektionskrankheiten und Krebs angewendet werden. Die attenuierten Salmonellen infizieren in der Maus über die natürliche Route antigenpräsentierende Zellen und setzen dort spontan DNA frei, die die Zellen transfiziert und eine spezifische Immunantwort auslösen kann. Die spontane Lyse basiert auf dem Zweiphasen-Expressionssystem für toxische Antigene in Salmonella. Phasenvariation wird durch die spontane Inversion eines definierten DNA-Elementes im Salmonella-Chromosom in einer Subpopulation erreicht. Abhängig von der Orientierung des inversiblen Elementes wird die T7-RNA-Polymerase exprimiert, die wiederum Gene transkribiert, die unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen. Das Gen E des Phagen Φ x 174, das das Lysisprotein E kodiert, bewirkt damit unter Kontrolle des T7-Promotors die Lyse der Zelle in der T7-Polymerase produzierenden Subpopulation.	
19. Schlagwörter Zweiphasensystem, attenuierte Salmonellen, DNA-Vektor, genetische Vakzinierung, T7-Polymerase, Gen E	
20. Verlag Elsevier Science Amsterdam	21. Preis 7,086 EUR/Jahr

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

BMBF - Förderschwerpunkt „Forschungsverbünde zur Somatischen Gentherapie“ (Förderkennzeichen 01 GE 9630/1)

Abschlußbericht

Rekombinante attenuierte Salmonellen als Vektoren für die genetische Vakzinierung gegen Infektionskrankheiten und Krebs

1. Zusammenfassung

Aufgabenstellung

Attenuierte intrazelluläre Bakterien sind vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung mukosaler DNA-Vektorsysteme (32, 41). Im Mausmodell resultiert die orale Gabe einer Salmonellen-DNA-Vakzine in der gezielten Transfektion und Aktivierung professioneller antigenpräsentierender Zellen (APC) der Darmschleimhaut, insbesondere dendritischer Zellen (DC), was zu einer humoralen und zellulären Immunantwort im mukosalen und systemischen Kompartiment gegen das plasmidkodierte Antigen führt (8, 26, 31). Wie die Plasmid-DNA aus den Salmonellen in der Wirtszelle freigesetzt wird und das Transgen zur Expression gelangt, ist unbekannt. Dem Transfer der Plasmid-DNA stehen mehrere Barrieren entgegen: i) die bakterielle Zellhülle, ii) die phagosomale Membran, iii) das Zytoplasma und iv) die Kernmembran. Ziel dieses Projektes war die Optimierung von Salmonellen-Impfstämmen für den gezielten DNA-Transfer in APC und damit die Entwicklung einer effektiven Methode der oralen DNA-Vakzinierung gegen Infektionskrankheiten und Krebs.

Voraussetzungen, Planung und Ablauf des Vorhabens

Ausgehend von den theoretischen Erfordernissen an ein optimales DNA-Transfersystem haben wir Carrierstämme für eine Salmonellenvakzine mit verschiedenen den DNA-Transfer unterstützenden Komponenten ausgestattet, ihre Funktionsfähigkeit *in vitro* getestet und die neuen Systeme auf ihre Wirksamkeit bei der Induktion antigenspezifischer Immunantworten im Mausmodell überprüft. Für die Konstruktion neuer Salmonellen-DNA-Vektoren haben wir das in unserem Labor etablierte Zweiphasenvariationssystem für die Expression toxischer Antigene (43, EP 0 565 548 und US 6,255,097) sowie das AIDA-Oberflächendisplaysystem verwendet (25, WO 97/35022). Eine breite Palette bakteriengenetischer Werkzeuge und Erfahrungen stand in unserem Labor zu Verfügung, um Integrationen in das bakterielle Chromosom vorzunehmen, Bakteriophagen als Quelle verschiedener Komponenten und Eigenschaften nutzbar zu machen und andere Systeme, z.B. das *Escherichia coli* Hämolysinsekretionssystem (*E. coli* Hly-System) an unsere Erfordernisse anzupassen.

Desweiteren sind Ergebnisse aus der Untersuchung von Eigenschaften *in vivo*-induzierter Promotoren in dieses Projekt eingeflossen (3). Die geplante Testung der neu konstruierten Salmonellenstämme als orale DNA-Vakzine in dem in unserem Labor etablierten *Helicobacter pylori*-Infektionsmodell in der Maus war nicht möglich, da die eukaryotische Expression des gewählten Antigens UreaseB problematisch ist. Alternativ haben wir das kleine Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) als Modellantigen verwendet. Bei der Evaluierung des Verlaufs der Salmonelleninfektion *in vivo* sowie der Charakterisierung von humoralen und zellulären Immunantworten sind in dieses Projekt langjährige Erfahrungen aus unserer Arbeitsgruppe eingeflossen (17, 24). Verschiedene neuartige Konstruktionen von Impfstämmen und eine anschließende systematische *in vitro*- und *in vivo*-Testung haben schließlich zu einer verbesserten oralen Salmonellen-DNA-Vakzine geführt und neue Ansatzpunkte zur weiteren Optimierung dieses DNA-Vektorsystems offenbart.

2. Stand des Wissens und die während der Durchführung des Vorhabens beim Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet bei anderen Stellen

Bakterielle Lebendimpfstoffe als Antigen- und DNA- Carrier

Bakterielle Lebendimpfstoffe wie der Typhusimpfstoff *Salmonella typhi* Ty21 und der Tuberkuloseimpfstoff Bacille Calmette-Guerin (BCG) sind Millionen von Menschen erfolgreich verabreicht worden und gelten als sicher und kostengünstig. Diese Impfstämme oder attenuierte Stämme anderer intrazellulärer Bakterien, z. B. Listerien oder Shigellen, können auf vielfältige Weise gentechnisch für den Transport heterologer Antigene programmiert werden (14). Der natürliche Infektionsverlauf intrazellulärer Bakterien ermöglicht die gezielte Freisetzung von Antigenen in Zellen des immuninduktiven Gewebes. Die Wahl eines bestimmten Carrierstamms in Kombination mit einem optimalen Antigenexpressionssystem ermöglicht die Induktion maßgeschneiderter humoraler und zellulärer Immunantworten (11).

Salmonellen sind bereits erfolgreich als Carrier heterologer Antigene in Tiermodellen und klinischen Studien verwendet worden. Dabei wurde die Stimulation von mukosalen, humoralen sowie zellvermittelten Immunantworten gegen viele verschiedene Antigene erreicht und somit eine Immunität gegen Bakterien-, Virus- oder Protozoeninfektionen induziert (32).

Ein Schwerpunkt in der Entwicklung neuartiger Vakzine liegt auf der Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunantwort, vor allem der Erzeugung einer CTL-Antwort, die für die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene und Tumore entscheidend ist. Ein sehr vielversprechender Ansatz dabei ist die Verwendung bakterieller Carrier für die Freisetzung eukaryotischer Expressionsplasmide in das Zytoplasma der infizierten Zelle (7, 8, 34). Die daraus resultierende Antigen synthese im Zytoplasma der Wirtszelle hat neben dem direkten Zugang zum MHC-I-Präsentationsweg eine Reihe weiterer Vorteile. Beispielsweise können auf DNA-Ebene leicht Antigenmodifikationen vorgenommen oder kostimulatorische Moleküle

in die eukaryotische Expressionskassette integriert werden (2, 22). Desweiteren werden z. B. virale Antigene in der eukaryotischen Zelle korrekt gefaltet und glykosyliert, wozu der bakterielle Carrier nicht in der Lage wäre (23). Die Verwendung intrazellulärer Bakterien als DNA-Vektoren hat sich in den letzten Jahren als neue Methode der DNA-Vakzinierung etabliert und ist auch für die Gentherapie von zunehmenden Interesse.

In Pionierstudien wurden Mitte der neunziger Jahre erstmals attenuierte Shigellen erfolgreich *in vitro* und *in vivo* für den DNA-Transfer verwendet (34). Diese Bakterien befreien sich nach Invasion der Wirtszelle aus dem Phagosom, lysieren möglicherweise aufgrund ihrer Attenuierung im Zytoplasma und setzen dort Plasmid-DNA frei. Listerien sind ebenfalls durch die Sekretion des porenformenden Zytolysins Listeriolysin O (LLO) befähigt, das Phagosom zu verlassen und sich im Zytoplasma der Zelle frei zu bewegen (6). Die Integration eines innerhalb der Wirtszelle induzierbaren Phagenlysesystems in einen abgeschwächten Listerienstamm führte zu einer deutlich verbesserten DNA-Übertragung *in vitro* (10). Dazu wurde der besonders dicht regulierte ActA-Promoter mit einem für Listerien spezifischen Phagenlysegen gekoppelt. Erst nach Eintritt der Bakterien in das Zytoplasma wird der ActA-Promoter aktiv und steuert die Expression des Lysegens (33), was zum Suizid der Bakterien und somit zur Freisetzung der eukaryotischen Expressionsplasmide führt.

Überraschend war die Entdeckung, daß auch Plasmid-DNA von Salmonellen in eukaryotische Zellen transferiert werden kann und daß so in Mäusen humorale und zelluläre Immunantworten gegen plasmidkodierte Antigene ausgelöst werden können (8). Anders als Shigellen oder Listerien proliferieren Salmonellen nach Invasion der Wirtszelle in einem adaptierten Phagosom und haben keinen Zugang zum Zytoplasma (15). Der Mechanismus des DNA-Transfers aus Salmonellen in den Kern infizierter Säugerzellen ist bislang wenig untersucht worden. Die Kombination von Salmonellen mit der durch den *E. coli* Hly-Transporter vermittelten Sekretion von LLO aus *Listeria monocytogenes* resultiert in der Freisetzung der Salmonellen aus ihrem natürlichen Kompartiment in das Zytoplasma (16). Mit diesem System wurde ein etwas verbesserter DNA-Transfer in einem *in vitro*-MHC-I-Präsentationsmodell demonstriert (5). Unter Verwendung verschiedener eukaryotischer Reporterplasmide konnte bisher nur eine minimale Transgenexpression nach Übertragung durch Salmonellencarrier in Zelllinien oder primären Makrophagen gezeigt werden (8, 18). Dagegen wurde im Mausmodell eindrucksvoll der DNA-Transfer aus Salmonellen in Makrophagen und DC gezeigt (26). Bei oraler Verabreichung werden Salmonellen direkt aus dem Darmlumen von DC aufgenommen (28). Möglicherweise wird aber auch in Makrophagen exprimiertes Antigen nach der durch Salmonellen induzierten Apoptose dieser Zellen sekundär von DC aufgenommen, ein als „cross-priming“ bezeichneter Vorgang (41). Der direkte Zugang von Salmonellen in professionelle APC, insbesondere DC, ist wahrscheinlich die Ursache für die effiziente Induktion humoraler und zellulärer Immunantworten im mukosalen und systemischen Kompartiment. Eine orale Salmonellen-HIV-1-Env-DNA-Vakzine wurde erfolgreich zur Induktion einer mukosalen CD8-T-Zellantwort verwendet (31). Da über 90% aller HIV-Infektionen über die genitalen Schleimhäute erfolgen, ist das möglicherweise eine besonders geeignete Strategie für die Entwicklung einer präventiven HIV-Vakzine (1, 39). In weiteren Modellen wurden durch die Verwendung

von Salmonellen-DNA-Vakzinen humorale und zelluläre Immunantworten gegen bakterielle, virale und tumorassoziierte Antigene induziert (8, 40, 42). Gentherapeutisch wurden Salmonellen-DNA-Vektoren erfolgreich bei der Reparatur einer IFN γ -Defizienz sowie für den CD40-L-Gentransfer in Mäusen (27, 36) angewendet.

Im Vergleich zu nackter DNA oder zu viralen und synthetischen DNA-Vektorsystemen machen mehrere Eigenschaften bakterielle DNA-Carrier besonders attraktiv: i) Plasmid-DNA kann gezielt in APC eingeschleust werden, insbesondere DC, ii) bakterielle DNA-Vektoren können durch Antibiotika kontrolliert werden, iii) neben dem DNA-Transfer können zusätzlich weitere Proteine, z.B. Immunmodulatoren von dem Bakterium in unterschiedlicher Form (löslich, membranständig oder sekretiert) produziert werden, iv) die angeborene Immunantwort wird aktiviert und v) verschiedene attenuiertere Stämme mit bestimmten Gewebetropismus sind verfügbar.

3. Eingehende Darstellung der erzielten wissenschaftlichen Ergebnisse

A. Konstruktion optimierter Salmonellenstämmen für die Freisetzung von eukaryonischer DNA ins Zytoplasma infizierter Säugerzellen

Mehrere Barrieren müssen überwunden werden damit eukaryotische Expressionsplasmide aus Salmonellen in den Kern infizierter Wirtszellen transferiert werden können. Die erste Voraussetzung für die Freisetzung von Plasmid-DNA ist die bakterielle Lyse. Basierend auf einem in unserem Labor entwickelten neuartigen Zweiphasensystem (43) zur Expression toxischer Antigene in Salmonellen (EP 0 565 548 und US 6,255,097) haben wir die Lysekomponente des Bakteriophagen Φ x174 Protein E bzw. das λ -Lyseoperons (21) für die Konstruktion eines spontanen Lysesystems verwendet. Die Lyse wird durch plötzliche Inversion eines definierten Fragmentes des bakteriellen Chromosoms in einem Teil der Salmonellen einer wachsenden Kultur initiiert. In Abhängigkeit von der Orientierung dieses invertierbaren Fragmentes wird T7-RNA-Polymerase (T7RNAP) produziert und initiiert die Expression des Lysefaktors, der unter der Kontrolle des T7-Promoters steht. Die Anzahl der Lyseereignisse kann durch die Inversionsrate gesteuert werden. Verschiedene Phasenvariationssysteme mit variierender Inversionsrate wurden von uns in die *aroA*-attenuierten *S. typhimurium* Stämme SL3261 und SL7207 integriert, können aber auch leicht auf andere Salmonellenimpfstämme übertragen werden. In DNA-Transferstudien wurde ein Phasenvariationssystem mit geringer und mit hoher Inversionsrate verglichen.

Die spontane bakterielle Lyse führt zur plötzlichen Freisetzung des bakteriellen Zellinhalts, einschließlich der Plasmid-DNA und zytoplasmatischer Proteine unterschiedlicher Größe. In einer logarithmisch wachsenden Protein E-vermittelten lytischen Kultur kann bis zu tausendfach mehr Plasmid-DNA aus dem Medium isoliert werden als aus einer Kultur des nichtlytischen Vergleichstamms. Ähnliches konnte auch für die Freisetzung von zytoplasmatischen Proteinen nachgewiesen werden. Als leicht zu quantifizierendes

Reporterprotein wurde β -Galaktosidase für den Vergleich der Effizienz verschiedener Lysedeterminanten verwendet. Im Gegensatz zum vollständigen λ -Lyseoperon zeigte eine verkleinerte Variante (Mini- λ) eine ähnliche lytische Aktivität wie Protein E. Ein weiterer von uns verfolgter Ansatz stellte die Etablierung eines gewebeinduzierten Lysesystems unter Verwendung der bekannten *in vivo* induzierten Promoter des *E. coli nirB*-Gens (35) oder des *S. typhimurium ssaH*-Gens (37) dar. Die Klonierung von Gen E unter Kontrolle dieser Promotoren gelang jedoch nicht, vermutlich aufgrund der Hintergrundaktivität beider Elemente. In unserem Labor wurde daher gezielt nach weiteren *in vivo* induzierbaren Promotoren gesucht. Bisher konnten mehrere derartige Promotoren identifiziert werden, wie unter anderem der *pibB*- und der *sifA*-Promoter (3).

In der eukaryotischen Wirtszelle befinden sich Salmonellen in einer membranbegrenzten Vakuole, dem Phagosom. Die Durchlässigkeit der phagosomalen Membran ist für die Passage der durch die bakterielle Lyse freigesetzten DNA in das Zytoplasma eine weitere wichtige Voraussetzung. Listeriolysin O (LLO) aus *L. monocytogenes* ist ein porenbildendes Protein und auf die Zerstörung der phagosomalen Membran spezialisiert. Für die LLO-Sekretion aus Salmonellen wurde das *E. coli* Hly-System (16) erfolgreich verwendet. Im direkten Vergleich war jedoch die Freisetzung zytoplasmatisch konstitutiv exprimierten LLO mit dem spontanen Lysesystem gegenüber der LLO-Sekretion via Hämolysesekretionssystem effizienter. Alternativ wurde der *E. coli* AIDA-Autotransporter (25) für den Transport von LLO auf die Zelloberfläche verwendet. Zu diesem Zweck wurde eine Linkersequenz mit einer spezifischen Schnittstelle zwischen dem Transporter und dem Passagierprotein inseriert, die für die durch die OmpT-Protease vermittelte Abspaltung von LLO bestimmt war. Jedoch konnte keine lytische LLO-Aktivität im Kulturüberstand dieses Stammes nachgewiesen werden. In Kombination oder alternativ zu konstitutiv exprimiertem LLO wurde das histonähnliche Protein TmHU des hyperthermophilen Bakteriums *Thermotoga maritima* (12) verwendet. Im Vergleich zu LLO ist TmHU für eine konstitutive Expression verträglicher, hat wahrscheinlich eine endosomal lytische Aktivität, schützt Plasmid-DNA durch unspezifische DNA-Bindung vor Nukleaseabbau und vermittelt den aktiven Kerntransport durch ein internes Kernlokalisationsignal. Desweiteren haben wir festgestellt, daß TmHU die Stabilität des eukaryotischen Expressionsplasmids erhöht. Verschiedene Kombinationen bakterieller Lysekomponenten mit LLO und/oder TmHU integriert in unterschiedliche Phasenvariationsstämme wurden *in vitro* und *in vivo* systematisch verglichen. Parallel zu den Lysesystemen wurde der *S. typhimurium*-Stamm χ 4072 (13) als Träger eukaryotischer Reporter- bzw. Antigenexpressionsplasmide getestet. Dieser Stamm ist aufgrund der Deletion des *asd*-Genlocus auxotroph für Diaminopimelinsäure, einem für die Zellwandsynthese notwendigen Substrat. Das plasmidkodierte *asd*-Gen kann in diesem Stamm zur Komplementation des Defektes und somit zur Stabilisierung von eukaryotischen Expressionsplasmiden verwendet werden.

B. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Effizienz des DNA-Transfers

Für *in vitro*-Reporterassays wurden verschiedene Epithel- oder Makrophagenzelllinien verwendet. Routinemäßig wurde vor allem die Affenierenzelllinie COS7 für die Testung der verschiedenen Systeme verwendet. Sie läßt sich besonders gut mit Salmonellen infizieren, ist apoptoseunempfindlich und toleriert eine intrazelluläre Bakterienlast bis zu 20-30 Cfu (colony forming units) pro Zelle, eine wichtige Voraussetzung für die Beobachtung einzelner, durch die spontane Lyse induzierter Ereignisse. Desweiteren ist diese Zelllinie stabil mit dem großen SV40 T-Antigen transfiziert, so daß intrazellulär freigesetzte Plasmid-DNA vermittelt durch den SV40-Replikationsursprung stark amplifiziert werden kann. Zunächst wurde ein indirekter Nachweis der Funktionstüchtigkeit des Protein E- und des Mini- λ -basierten Lysesystems in COS7-Zellen erbracht. Dafür wurden Konstrukte hergestellt, die das GFP-Gen allein oder in trans zu der Lysekomponente tragen, jeweils unter Kontrolle des T7-Promoters. Diese Konstrukte wurden in Phasenvariationsstämme transformiert und für die Infektion von COS7-Zellen verwendet. Aufgrund spontaner T7RNAP-Expression kann die GFP-Expression einiger intrazellulärer Bakterien beobachtet werden, die das Konstrukt ohne Lysekomponente tragen. Befinden sich jedoch Gen E oder Mini- λ in trans auf dem Konstrukt, kommt es nicht zum Aufleuchten intrazellulärer Salmonellen. Das zeigt, daß beide Lysekomponenten unter den Bedingungen des Phagosoms die schnelle spontane Desintegration der bakteriellen Zelle herbeiführen. COS7-Zellen wurden mit einem Protein E/LLO gekoppelten lytischen Stamm infiziert und elektronenmikroskopisch untersucht. Einzelne Salmonellen wurden frei im Zytoplasma der Wirtszellen nachgewiesen. Jedoch haben wir mit keinem unserer neuen Lysesysteme in COS7-Zellen, in der Maus-Makrophagen-Zelllinie J774.A oder in primären peritonealen Makrophagen überzeugende Transgenexpressionraten erhalten.

Die neukonstruierten Salmonellen-DNA-Vektoren wurden schließlich in Mäusen evaluiert. Zunächst wurde der Infektionsverlauf und die Stabilität der Expressionsplasmide verglichen. Während plasmidtragende Salmonellen des *asd*-stabilisierten Systems über den gesamten Infektionszeitraum aus dem Gewebe wiedergewonnen werden können, gehen die Expressionsplasmide der lytischen Stämme sehr schnell verloren. Allerdings wurde die Plasmidstabilität *in vivo* durch TmHU etwas verbessert. Als Modellantigen für anschließende DNA-Vakzinierungsstudien haben wir das kleine Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) (9, 30) verwendet. Dabei wurden HBsAg-spezifische humorale und zelluläre Immunantworten nach oraler Verabreichung der Salmonellen-DNA-Vakzine, intramuskulärer Injektion nackter DNA und intraperitonealer Injektion des gereinigten Proteins miteinander verglichen. Die applizierte Dosis nackter DNA war tausendmal so groß wie die in den Carrierstämmen enthaltene DNA-Menge. Während nach der Proteinimmunisierung die stärkste humorale Immunantwort induziert wurde, konnte mit einem ProteinE/TmHU gekoppelten lytischen Salmonellenstamm eine zur Vakzinierung mit nackter DNA vergleichbare oder höhere Antikörperantwort induziert werden. Die stärkste HBsAg-spezifische zytotoxische T-Lymphocyten (CTL)-Antwort wurde durch intramuskuläre DNA-Injektion stimuliert, dicht gefolgt von der lytischen oralen DNA-Vakzine. Der nichtlytische Vergleichsstamm verfehlte die Stimulation HBsAg-spezifischer Antikörper- und CTL-Antworten. Die *asd*-

plasmidstabilisierte orale DNA-Vakzine stimulierte ebenfalls eine HBsAg-spezifische humorale Antikörperantwort. Aus diesen Mäusexperimenten geht hervor, daß der neue lytische Salmonellen-DNA-Vektor dem herkömmlichen Vektor in der Stimulation humoraler und zellulärer Immunantworten überlegen ist. Im Vergleich zur intramuskulären DNA-Injektion ist tausendfach weniger durch Salmonellen transferierte DNA ausreichend, um eine systemische Immunantwort in gleicher Stärke zu induzieren.

Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse und Erfolge

Die Entwicklung mukosaler DNA-Vakzine ist ein Schwerpunkt der modernen Impfstoffforschung (38). Insbesondere für die Entwicklung einer präventiven HIV-Vakzine ist dieser Ansatz vielversprechend (1, 31). In diesem Projekt wurde auf der Basis attenuierter Salmonellenimpfstämme ein neuartiges DNA-Vektorsystem konstruiert und im Mausmodell evaluiert. Gegenüber dem herkömmlichen Carrierstamm ist unser spontan lytisches Vektorsystem in der Stimulation humoraler und zellulärer Immunantworten überlegen. Protektive Antigene beliebiger Herkunft sowie weitere Faktoren, z. B. Immunomodulatoren, können leicht in den Carrier integriert werden und für die genetische Vakzinierung gegen Infektionskrankheiten und Krebs angewendet werden. Weitere Verbesserungen des Salmonellen-DNA-Vektors können aufgrund der gesammelten Erfahrungen in Zukunft zielgerichtet vorgenommen werden.

Vom Zuwendungsempfänger selbst oder von eingeschalteten Dritten gemachte oder in Anspruch genommene Erfindungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte sowie deren Verwertung

Patente wurden nicht angemeldet, Erfindungen nicht in Anspruch genommen.

Literatur

1. **Belyakov, I. M., Z. Hel, B. Kelsall, V. A. Kuznetsov, J. D. Ahlers, J. Nacsa, D. I. Watkins, T. M. Allen, A. Sette, J. Altman, R. Woodward, P. D. Markham, J. D. Clements, G. Franchini, W. Strober, and J. A. Berzofsky.** 2001. Mucosal AIDS vaccine reduces disease and viral load in gut reservoir and blood after mucosal infection of macaques. *Nat.Med.* **7**:1320-1326.
2. **Boyle, J. S., J. L. Brady, and A. M. Lew.** 1998. Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature* **392**:408-411.
3. **Bumann D.** 2002. Examination of Salmonella gene expression in an infected mammalian host using the green fluorescent protein and two-colour flow cytometry. *Mol Microbiol.* **43**:1269-83.

4. **Bumann, D.** 2001. Regulated antigen expression in live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strongly affects colonization capabilities and specific CD4(+)-T-cell responses. *Infect.Immun.* **69**:7493-7500.
5. **Catic, A., G. Dietrich, I. Gentschev, W. Goebel, S. H. Kaufmann, and J. Hess.** 1999. Introduction of protein or DNA delivered via recombinant *Salmonella typhimurium* into the major histocompatibility complex class I presentation pathway of macrophages. *Microbes.Infect.* **1**:113-121.
6. **Cossart, P. and M. Lecuit.** 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* **17**:3797-3806.
7. **Courvalin, P., S. Goussard, and C. Grillot-Courvalin.** 1995. Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C.R.Acad.Sci.III* **318**:1207-1212.
8. **Darji, A., C. A. Guzman, B. Gerstel, P. Wachholz, K. N. Timmis, J. Wehland, T. Chakraborty, and S. Weiss.** 1997. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* **91**:765-775.
9. **Davis, H. L., M. L. Michel, and R. G. Whalen.** 1993. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum.Mol.Genet.* **2**:1847-1851.
10. **Dietrich, G., A. Bubert, I. Gentschev, Z. Sokolovic, A. Simm, A. Catic, S. H. Kaufmann, J. Hess, A. A. Szalay, and W. Goebel.** 1998. Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes* [see comments]. *Nat.Biotechnol.* **16**:181-185.
11. **Drabner, B. and C. A. Guzman.** 2001. Elicitation of predictable immune responses by using live bacterial vectors. *Biomol.Eng* **17**:75-82.
12. **Esser, D., H. Amanuma, A. Yoshiki, M. Kusakabe, R. Rudolph, and G. Bohm.** 2000. A hyperthermostable bacterial histone-like protein as an efficient mediator for transfection of eukaryotic cells. *Nat.Biotechnol.* **18**:1211-1213.
13. **Galan, J. E., K. Nakayama, and R. Curtiss, III.** 1990. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene* **94**:29-35.
14. **Galen, J. E. and M. M. Levine.** 2001. Can a 'flawless' live vector vaccine strain be engineered? *Trends Microbiol.* **9**:372-376.
15. **Garcia-del Portillo, F. and B. B. Finlay.** 1995. Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J.Cell Biol.* **129**:81-97.
16. **Gentschev, I., Z. Sokolovic, H. J. Mollenkopf, J. Hess, S. H. Kaufmann, M. Kuhn, G. F. Krohne, and W. Goebel.** 1995. *Salmonella* strain secreting active listeriolysin changes its intracellular localization. *Infect.Immun.* **63**:4202-4205.
17. **Gomez-Duarte, O. G., B. Lucas, Z. X. Yan, K. Panthel, R. Haas, and T. F. Meyer.** 1998. Protection of mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori* by single

- oral dose immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing urease subunits A and B. *Vaccine* **16**:460-471.
18. **Grillot-Courvalin, C., S. Goussard, and P. Courvalin.** 2002. Wild-type intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells. *Cell Microbiol.* **4**:177-186.
 19. **Hess, J., I. Gentschev, D. Miko, M. Welzel, C. Ladel, W. Goebel, and S. H. Kaufmann.** 1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:1458-1463.
 20. **Hoiseth, S. K. and B. A. Stocker.** 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**:238-239.
 21. **Jain, V. and J. J. Mekalanos.** 2000. Use of lambda phage S and R gene products in an inducible lysis system for *Vibrio cholerae*- and *Salmonella enterica* serovar typhimurium-based DNA vaccine delivery systems. *Infect.Immun.* **68**:986-989.
 22. **Kim, J. J., M. L. Bagarazzi, N. Trivedi, Y. Hu, K. Kazahaya, D. M. Wilson, R. Ciccarelli, M. A. Chattergoon, K. Dang, S. Mahalingam, A. A. Chalian, M. G. Agadjanyan, J. D. Boyer, B. Wang, and D. B. Weiner.** 1997. Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes. *Nat.Biotechnol.* **15**:641-646.
 23. **Leonard, C. K., M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, and T. J. Gregory.** 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem.* **265**:10373-10382.
 24. **Lucas, B., D. Bumann, A. Walduck, J. Koesling, L. Develioglu, T. F. Meyer, and T. Aebischer.** 2001. Adoptive transfer of CD4+ T cells specific for subunit A of *Helicobacter pylori* urease reduces *H. pylori* stomach colonization in mice in the absence of interleukin-4 (IL-4)/IL-13 receptor signaling. *Infect.Immun.* **69**:1714-1721.
 25. **Maurer, J., J. Jose, and T. F. Meyer.** 1997. Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **179**:794-804.
 26. **Paglia, P., E. Medina, I. Arioli, C. A. Guzman, and M. P. Colombo.** 1998. Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* **92**:3172-3176.
 27. **Paglia, P., N. Terrazzini, K. Schulze, C. A. Guzman, and M. P. Colombo.** 2000. In vivo correction of genetic defects of monocyte/macrophages using attenuated *Salmonella* as oral vectors for targeted gene delivery. *Gene Ther.* **7**:1725-1730.
 28. **Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat.Immunol.* **2**:361-367.

29. **Russmann, H., E. I. Igwe, J. Sauer, W. D. Hardt, A. Bubert, and G. Geginat.** 2001. Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing hybrid *Yersinia* type III proteins. *J.Immunol.* **167**:357-365.
30. **Schirmbeck, R. and J. Reimann.** 2001. Revealing the potential of DNA-based vaccination: lessons learned from the hepatitis B virus surface antigen. *Biol.Chem.* **382**:543-552.
31. **Shata, M. T., M. S. Reitz, Jr., A. L. DeVico, G. K. Lewis, and D. M. Hone.** 2001. Mucosal and systemic HIV-1 Env-specific CD8(+) T-cells develop after intragastric vaccination with a *Salmonella* Env DNA vaccine vector. *Vaccine* **20**:623-629.
32. **Shata, M. T., L. Stevceva, S. Agwale, G. K. Lewis, and D. M. Hone.** 2000. Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Mol.Med.Today* **6**:66-71.
33. **Shetron-Rama, L. M., H. Marquis, H. G. Bouwer, and N. E. Freitag.** 2002. Intracellular induction of *Listeria monocytogenes actA* expression. *Infect.Immun.* **70**:1087-1096.
34. **Sizemore, D. R., A. A. Branstrom, and J. C. Sadoff.** 1995. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* **270**:299-302.
35. **Tyson, K. L., A. I. Bell, J. A. Cole, and S. J. Busby.** 1993. Definition of nitrite and nitrate response elements at the anaerobically inducible *Escherichia coli nirB* promoter: interactions between FNR and NarL. *Mol.Microbiol.* **7**:151-157.
36. **Urashima, M., H. Suzuki, Y. Yuza, M. Akiyama, N. Ohno, and Y. Eto.** 2000. An oral CD40 ligand gene therapy against lymphoma using attenuated *Salmonella typhimurium*. *Blood* **95**:1258-1263.
37. **Valdivia, R. H. and S. Falkow.** 1997. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* **277**:2007-2011.
38. **van Ginkel, F. W., H. H. Nguyen, and J. R. McGhee.** 2000. Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg.Infect.Dis.* **6**:123-132.
39. **Veazey, R. S., P. A. Marx, and A. A. Lackner.** 2001. The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS. *Trends Immunol.* **22**:626-633.
40. **Wedemeyer, H., S. Gagneten, A. Davis, R. Bartenschlager, S. Feinstone, and B. Rehermann.** 2001. Oral immunization with HCV-NS3-transformed *Salmonella*: induction of HCV-specific CTL in a transgenic mouse model. *Gastroenterology* **121**:1158-1166.
41. **Weiss, S. and S. Krusch.** 2001. Bacteria-mediated transfer of eukaryotic expression plasmids into mammalian host cells. *Biol.Chem.* **382**:533-541.
42. **Xiang, R., H. N. Lode, T. H. Chao, J. M. Ruehlmann, C. S. Dolman, F. Rodriguez, J. L. Whitton, W. W. Overwijk, N. P. Restifo, and R. A. Reisfeld.** 2000. An autologous oral DNA vaccine protects against murine melanoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:5492-5497.
43. **Yan, Z. X. and T. F. Meyer.** 1996. Mixed population approach for vaccination with live recombinant *Salmonella* strains. *J Biotechnol.* **44**:197-201.

Liste eigener Publikationen von Vorhabensergebnissen

Spehr V, Frahm D, and Meyer TF. 2000. Improvement of the T7 expression system by the use of T7 lysozyme. *Gene* 257:259-67.

Spehr, V., Loessner, H., Yan, Z. X., Schaap, D., and Meyer, T. F. A novel system for the continuous expression of toxic proteins in culture. In Vorbereitung.

Loessner, H., Spehr, V., and Meyer, T. F. Optimization of *Salmonella*-based vaccines for genetic vaccination. *Biospektrum Sonderausgabe* 2001. (Poster VAAM-Tagung Oldenburg)

Loessner, H., Spehr, V., and Meyer, T. F. Comparison of lysis determinants derived from bacteriophages phiX174 and Lambda in a novel *Salmonella* DNA delivery system. *Int.J.Med.Microbiol.* 291[32 supplement]. 2001 (Poster DGHM-Tagung Aachen).

Loessner, H., Spehr, V., Guzman, C. A., and Meyer, T. F. Towards an improved *Salmonella*-based hepatitis B surface antigen DNA vaccine. Abstractbook Workshop "Viruslike particles as vaccines", Charité, Berlin, Germany. 2001 (Vortrag).

Loessner, H., V. Spehr, and T. F. Meyer. 2002. Spontaneous phage phiX174 Protein E mediated lysis of an attenuated *Salmonella* vaccine strain results in the release of plasmid DNA and active listeriolysin O. In Vorbereitung.

Loessner, H., Guzman, C. A., Spehr, V., and Meyer, T. F. 2002. Improved immunogenicity of an oral HBsAg DNA vaccine delivered by a spontaneous *Salmonella* lysis system. In Vorbereitung.