

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