

**Entwicklung und präklinische Testung  
rekombinanter Vakzinekandidaten  
gegen die Infektion mit  
*Bacillus anthracis***

**Habilitationsschrift für das Fachgebiet  
Veterinärmedizinische Mikrobiologie und Immunologie**

**vorgelegt von**

**Dr. med. vet. Wolfgang Beyer**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
Zusammenfassung	11
Summary	14
1. Einleitung	17
2. Literaturübersicht	18
Entstehung und Stand der heute verwendeten Anthrax-Vakzinen	18
Pathogenese der Milzbrandinfektion	20
Rekombinantes Protektives Antigen (PA), das Hauptantigen von <i>B. anthracis</i>	22
Rekombinante Vakzinen auf der Basis von <i>B. subtilis</i> und <i>B. anthracis</i>	25
Versuche zur oralen Immunisierung mittels bakterieller Lebendvakzine	26
Die Kapsel und weitere bakterielle Antigene	32
Versuche zur Wirkung verschiedener Adjuvantien	34
Rekombinante Plasmide zur DNA-Vakzinierung	36
3. Material und Methoden	38
3.1 Plasmide und Vektoren	38
3.2 Bakterienstämme	39
3.3 Oligonukleotide	40
3.4. Gentechnische Standardmethoden	41
3.5 Detektion von Proteinbanden aus rekombinanten Bakterien im Immunoblot	41
3.5.1. Vorbereitung der Bakterien	41
3.5.2. Protein-Blotting und Detektion	43
3.6 Präparation von rekombinantem PA aus <i>E. coli</i> mittels FPLC	42
3.7 ELISA für die Bestimmung von Serumantikörpern	45
3.8 Primärzellkulturen aus Mäusemilzen	46
3.9 In vitro Stimulation von Milzzellen zur Induktion von IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5	48
3.10 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Milzzellkulturüberständen	48
3.11 Bestimmung des Toxin-Neutralisationstiter	48
3.12 Zellproliferationstest in Blutleukozyten	50
3.13 Transfektion von Cos-7 Zellen in Mikrotiterplatten	51
3.14 Immunfärbung transfizierter Cos-7 Zellen	51
3.15 Herstellung der Sporensuspensionen für <i>B. anthracis</i>	54

	<b>Seite</b>
3.16 Immunisierung von Versuchstieren	55
3.16.1 Orale Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen	55
3.16.2 DNA-Vakzinierung – intramuskulär	56
3.16.3 DNA-Vakzinierung mit der „Gene Gun“	56
3.16.4 Immunisierung mit rekombinantem PA und Adjuvantien	51
3.17 Belastungsinfektionen mit Lebendsporen von <i>B. anthracis</i>	60
3.18 Belastung mit dem Letaltoxin	61
3.19 Klonierung der prokaryontischen Expressionskassetten	61
3.20 Stabilitätstest für plasmidkodierte Expressionskassetten in Salmonellen	64
3.21 Klonierung der eukaryontischen Expressionskassetten	64
3.21.1 Klonierung von pSecTag	64
3.21.2 Klonierung von pCMV/ER (Invitrogen)	64
3.21.3 Klonierung von pcDNA4 (Invitrogen)	65
3.21.4 Klonierung von pVAX (Invitrogen)	66
3.21.5 Klonierung des Exosporium-Antigens BclA im Expressionsvektor pQE30	67
3.21.6 Klonierung einer eukaryontischen Expressionskassette mit dem Exosporium-Antigen BclA im Vektor pSecTag2B	68
3.22 Statistische Methoden	68
4. Ergebnisse	69
4.1 Entwicklung von Mausmodellen zum Nachweis der Immunität gegen eine Infektion mit Lebendsporen von <i>B. anthracis</i> nach Immunisierung mit rPA-Vakzinen	69
4.1.1 Prüfung eines Belastungsmodells für A/J- und NMRI-Mäuse	69
4.1.1.1 Ermittlung der mittleren letalen Dosis (LD <sub>50</sub> ) von Sporen des Stammes STI für das A/J-Mausmodell	69
4.1.1.2 Ermittlung der LD <sub>50</sub> für das NMRI-Mausmodell	70
4.1.1.3 Belastung von nicht immunisierten A/J-Mäusen mit Letaltoxin	70
4.1.1.4 Belastung von nicht immunisierten Balb/c-Mäusen mit Letaltoxin	71
4.1.2 Evaluierung einer Positiv-Kontrolle für das NMRI-Mäusemodell	72

	<b>Seite</b>
4.2 Immunantworten und Schutzraten im Maus- und Kaninchenmodell nach Immunisierung mit rekombinantem PA und verschiedenen Adjuvantien	73
4.2.1 Vergleich der Immunisierung von Balb/c und A/J Mäusen mit rekombinantem PA und RIBI-Adjuvans	73
4.2.2 Optimierung der Vakzinierung mit dem rekombinanten PA83 aus <i>E. coli</i> und verschiedenen Adjuvantien im NMRI-Mausmodell	73
4.2.3 Vergleichende Vakzinierung von Kaninchen mit AVA und rPA/Lipopeptid	79
4.3 Immunantworten und Schutzraten im Maus- und Kaninchenmodell nach Immunisierung mit rekombinanten DNA-Vakzinen	82
4.3.1 Vergleichende DNA-Immunisierung intramuskulär und mit der Gene Gun, im Balb/c-Mausmodell	82
4.3.2 DNA-Immunisierung im A/J-Mausmodell	87
4.3.2.1 Immunisierung mit der Domäne 4 des PA im A/J-Mausmodell mittels Gen Gun und Belastungsinfektion mit Sporen vom Stamm STI	91
4.3.2.2 Optimierung der DNA-Applikation mittels Gene Gun im NMRI-Mausmodell	94
4.3.3 DNA-Immunisierung mit der Kombination aus PA83- und BclA-kodierenden Plasmiden mit der Gen Gun im NMRI-Mausmodell	97
4.3.4 DNA-Immunisierung von Kaninchen	101
4.3.5 DNA-Immunisierung von Schafen	102
4.4 Immunantworten und Schutzraten im Mausmodell nach Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen	105
4.4.1 Charakterisierung der Konstruktionen zur Expression von PA83 und PA63 im Impfstamm Zoosaloral H	105
4.4.1.1 Prüfung der prokaryontischen Konstruktionen auf Expression und Sekretion von PA im Zoosaloral H	105
4.4.1.2 Nachweis der immunologischen Reaktivität der exprimierten Antigene mit humanen Seren	107

	<b>Seite</b>
4.4.1.3 Stabilitätstest für Expressionskassetten auf pro- und eukaryontischen Plasmiden	107
4.4.1.4 Bestimmung der Generationszeiten rekombinanter <i>Salmonella</i> -Klone <i>in vitro</i>	109
4.4.2 Orale Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit prokaryontischen und eukaryontischen PA exprimierenden Konstruktionen im Zoosaloral H	110
4.4.3 Orale Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen und Belastungsinfektion mit Lebendsporen vom Stamm STI im A/J-Mausmodell	115
5. Zusammenfassung und Bewertung	121
Auswahl und Optimierung von Tiermodellen für Infektionsversuche mit Lebendsporen von <i>B. anthracis</i>	121
Immunantworten und Schutzraten im Maus- und Kaninchenmodell nach Immunisierung mit rekombinantem PA und verschiedenen Adjuvantien	123
Immunantworten und Schutzraten im Maus- und Kaninchenmodell nach Immunisierung mit rekombinanten DNA-Vakzinekandidaten	126
Immunantworten und Schutzraten in verschiedenen Mausmodellen nach Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen	132
6. Ausblick	137
7. Literaturverzeichnis	139
Danksagung	151
Anhang	153

## Abbildungsverzeichnis

Abb.		Seite
1	smus der Zellintoxikation durch die Toxine von <i>B. anthracis</i>	23
2	Schema der Kristallstruktur des PA83 Proteins	24
3	CMIS (Common Mucosal Immune System)	30
4	Klonierungsschema für prokaryontische Expressionskassetten	63
5	Bestimmung der LD <sub>50</sub> im A/J-Mausmodell mit Sporen des russischen Vakzinestammes STI	69
6	Bestimmung der LD <sub>50</sub> im NMRI-Mausmodell mit Sporen des Stammes Ames	70
7	Überlebensraten von nicht immunisierten A/J-Mäusen nach Belastungsinfektion mit Lebendsporen der Stämme STI oder Ames	71
8	Etablierung einer Positivkontrolle zur Immunisierung von NMRI-Mäusen mit rPA-Vakzinen	72
9	Anti-PA ELISA Titer und NT <sub>50</sub> von (A) Balb/c-Mäusen und (B) A/J Mäusen nach Immunisierung mit rekombinantem PA83 und RIBI-Adjuvans	73
10	Modell des Lipopeptid-Adjuvans	74
11	Titer für NMRI-Mäuse nach Immunisierung mit rPA83 und Lipopeptid-Adjuvans im Vergleich zur Ah/LP-Adjuvansmischung, vor der Belastungsinfektion	75
12	Überlebensraten von NMRI-Mäusen nach Immunisierung mit rPA83 und Lipopeptid-Adjuvans im Vergleich zur Ah/LP-Adjuvansmischung, Challenge s. c., mit 290 Sporen des Stammes Ames	75
13	AntiPA-ELISA Titer und NT <sub>50</sub> für NMRI-Mäuse nach Immunisierung mit rPA83 und Alhydrogel oder Lipopeptid als Adjuvans	76
14	Zytokinwerte für NMRI-Mäuse nach Immunisierung mit rPA83 und Alhydrogel oder Lipopeptid als Adjuvans	77
15	Überlebensraten von NMRI-Mäusen nach Immunisierung mit rPA83 und Lipopeptid oder Alhydrogel als Adjuvans und einer Belastungsinfektion, s. c., mit 800 Sporen des Stammes Ames	78
16	Korrelation in NMRI-Mäusen zwischen antiPA ELISA-Titern, NT <sub>50</sub> und dem Überleben nach Infektion mit der 21fachen LD <sub>50</sub> Sporen vom Stamm Ames	79

<b>Abb.</b>		<b>Seite</b>
17	AntiPA ELISA- und Neutralisationstiter von Kaninchen vor der Belastungsinfektion, nach 2 Immunisierungen mit einer Proteinvakzine und verschiedenen Adjuvantien	80
18	Challenge von Kaninchen mit Sporen vom Stamm Ames nach Immunisierung mit rPA83 und LP oder AVA im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne Antigengabe	81
19	AntiPA-Endpunkttiter nach i. m. DNA-Immunsierung von Balb/c-Mäusen Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Meßwerte für gesamt Ig sowie die IgG-Subklassen 1 und 2a.	84
20	AntiPA-Antiköpertiter nach GG DNA-Immunsierung von Balb/c-Mäusen Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Meßwerte für gesamt Ig sowie die IgG-Subklassen 1 und 2a.	85
21	Zytokinwerte der Milzzellkulturen von i. m. immunisierten Balb/c-Mäusen nach 58 h Inkubation mit rPA83	85
22	Zytokin-Werte im Medium der Milzzellkulturen von GG immunisierten Balb/c-Mäusen nach Inkubation mit rPA83	86
23	AntiPA spezifische Titer von (A) Balb/c-Mäusen und (B) A/J-Mäusen nach DNA-Immunsierung mit der Gen Gun	89
24	Überlebensraten von A/J-Mäusen nach Belastungsinfektion mit $1.5 \times 10^6$ Sporen ( $100 \times LD_{50}$ ) vom Stamm STI	90
25	Expression des PA83 aus (A) pCMV/ERPA83 und (B) pSecTag PA83 in COS7-Zellen	91
26	(A) Expression des ivcPAd4-Fusionsproteins aus pVAXivcPAd4 in COS7-Zellen, (B) Zellen nach Transfektion mit dem Vektor ohne Fremdgen	91
27	Immunisierung mit pVAXivcPAd4 mittels Gen Gun im A/J-Mausmodell AntiPA-Titer der Einzeltiere vor dem Belastungsinfektion, nach Applikation von 1 oder 2 Patronen pro Immunisierung	92
28	Immunisierung mit pCMV/ERivcPAd4 mittels Gen Gun im A/J-Mausmodell AntiPA-Titer der Einzeltiere vor dem Belastungsinfektion, nach Applikation von 1 oder 2 Patronen pro Immunisierung	93
29	Überlebensraten von A/J-Mäusen nach Immunisierung mit pVAXivcPAd4 und pCMV/ERivcPAd4	93
30	-PA ELISA- und Ltx-Neutralisationstiter nach optimierter DNA-Immunsierung mit der Gen Gun im A/J-Mausmodell	95

<b>Abb.</b>		<b>Seite</b>
31	Belastungsinfektion mit $1,1 \times 10^6$ ( $100 \times LD_{50}$ ) Sporen vom Stamm STI nach optimierter DNA-Immunisierung mit der Gen Gun im A/J-Mausmodell	95
32	Korrelation in A/J-Mäusen zwischen antiPA ELISA-Titern bzw. dem $NT_{50}$ und dem Überleben nach Infektion mit der 100fachen $LD_{50}$ STI-Sporen	96
33	Expressionstest für das bclA-Gen im Vektor pSecTag (A) mit myc- und His-Marker und (B) ohne Marker	97
34	AntiPA ELISA- und Neutralisationstiter für NMRI-Mäuse nach Immunisierung mit der Gen Gun, Einzeltiertiter vor dem Belastungsinfektion	99
35	Überleben von NMRI-Mäusen nach DNA-Immunisierung mit der Gen Gun und Belastungsinfektion mit $9,3 \times 10^2$ Sporen ( $25 \times LD_{50}$ ) vom Stamm Ames	100
36	AntiPA- und antiBclA-Titer nach DNA-Immunisierung von Kaninchen mit PA83- und BclA-kodierenden Plasmiden	102
37	AntiPA ELISA-Titer nach i. m. DNA-Immunisierung von Schafen	103
38	PA spezifische Lymphozytenproliferation in vitro, 1 Jahr nach i.m. DNA-Immunisierung von Schafen	104
39	Immunoblot der Proteine aus rekombinanten Salmonellen	106
40	Immunoblot von Lysaten rekombinanter Salmonellen mit (A) humanem Hyperimmenserum und (B) Serum einer nicht immunisierten Person	107
41	Wachstumskurven zur Bestimmung der Generationszeit rekombinanter Salmonellen in vitro	109
42	Anti-rPA83 Endtiter von Balb/c-Mäusen nach oraler Immunisierung mit prokaryontischen Expressionskassetten im Zoosaloral H	112
43	Anti-rPA83 Endtiter von Balb/c-Mäusen nach oraler Immunisierung mit eukaryontischen Expressionskassetten in Zoosaloral H	113
44	Zytokinwerte nach Stimulation von Milzzellen mit rPA83 nach 60 h in vitro Immunisierung mit rekombinante Salmonellen mit prokaryontischen Expressionskassetten	113
45	Zytokinwerte nach Stimulation von Milzzellen mit rPA83, nach 60 h, in vitro. Immunisierung mit rekombinante Salmonellen mit eukaryontischen Expressionskassetten	114

<b>Abb.</b>		<b>Seite</b>
47	Anti-PA Endtiter von A/J-Mäusen nach oraler Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen	116
48	Antigen spezifische Titer im Serum von A/J-Mäusen nach oraler Immunisierung mit ZpVDLPA83ec und ZpUTKmPA83ec	117
49	Überleben von A/J-Mäusen nach einer Belastungsinfektion mit $1.5 \times 10^6$ STI Lebendsporen, nach Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen	118
50	Überleben von A/J-Mäusen in Relation zu antiPA-gesamtIg Titern vor der Belastungsinfektion	118

### **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle</b>		<b>Seite</b>
1	Verwendete Plasmide und Vektoren	38
2	Verwendete Bakterienstämme	39
3	Verwendete Primer zur Klonierung	40
4	Für die Detektion verwendete Antikörper	42
5	Reagenten nach i. m. DNA-Immunisierung von Balb/c-Mäusen	87
5a	Reagenten nach DNA-Immunisierung von Balb/c-Mäusen mittels Gene Gun	87
6	Titerwerte und Überlebensdaten von A/J-Mäusen nach DNA-Immunisierung mit der Gen Gun und Belastungsinfektion mit $1,5 \times 10^6$ Sporen vom Stamm STI	90
7	Plasmidstabilität für eukaryontische Expressionskassetten im Zoosaloral H <i>in vitro</i>	108
8	Generationszeiten für Reisolat rekombinanter Salmonellen <i>in vitro</i>	110
9	Orale Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit rekombinanten Salmonellen	110
10	Reagenten pro Gruppe nach oraler Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen im Balb/c-Mausmodell	115
11	Immunisierung mit PA exprimierenden Salmonellen und Belastungsinfektion mit Lebendsporen vom Stamm STI im A/J-Mausmodell	119

## Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotikum/Antibiotika
Ak	Antikörper
APC	Antigen Presenting Cell
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Anthrax Toxin Rezeptor
AVA	Anthrax Vaccine Adsorbed
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
CMV	Cytomegalovirus
EF	Endotoxin frei
EF	Edema factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötales Kälberserum
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatographie
HRP	Horse Radish Peroxidase
i. d.	intradermal
i. m.	intramuskulär
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LD50	mittlere letale Dosis
LF	Letalfaktor
Ltx	Letaltoxine
mAk	monoklonale Antikörper
MAPKK	Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
NT50	mittlerer Neutralisationstiter
NZW	New Zealand White
OD	Optische Dichte
PA	Protektives Antigen
PA20	20 kDa-Fragment des PA

PA63	63 kDa-Fragment des PA
PA83	matures PA
PAd4	Domäne 4 des PA
PBS	Phosphate Buffered Saline
pDNA	Plasmid-DNA
rPA	rekombinantes PA
RT	Raumtemperatur
s. c.	subkutan
SD	Standard Deviation
SE	Standard Error
Th	T-Helferzelle
Th1	T-Helferzelle Subtyp 1
Th2	T-Helferzelle Subtyp 2
ÜN	über Nacht
USAMRIID	United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases

## **Zusammenfassung**

Die epidemiologische Bedeutung der Milzbrandkrankung liegt zum einen in ihrer Eigenschaft, als Zoonose beim Menschen tödlich verlaufende Infektionen verursachen zu können, zum anderen ist sie die Ursache erheblicher Verluste bei Nutz- und Wildtieren. Besondere Aufmerksamkeit verdient der Schutz gegen *Bacillus anthracis* vor dem Hintergrund seiner mehrfach nachgewiesenen Integration in Biowaffenprogramme verschiedener Länder sowie seiner nachgewiesenen Freisetzung bei bioterroristischen Anschlägen. Beunruhigend sind darüber hinaus publizierte Forschungen zur Ausstattung von *B. anthracis* mit Toxin-Genen anderer Spezies sowie mit Multi-Resistenzkassetten, die kaum noch eine Möglichkeit zur Behandlung einer Infektion mit Antibiotika offen lassen würden. Dieser Hintergrund macht den hohen Forschungsbedarf zu Fragen der immunologischen Prävention und Therapie der Erkrankung deutlich. Ein weiterer Anlaß, sich auch in Deutschland mit der Entwicklung einer Vakzine zu befassen, war die äußerst limitierte Verfügbarkeit der beiden zur Zeit in England oder in den USA hergestellten Humanvakzinen. Beide werden nicht frei gehandelt und sind deshalb schwierig zu beziehen. Darüber hinaus sind beide Vakzinen mit einer Reihe von Nachteilen behaftet, die sowohl ihre Effektivität als auch ihre Verträglichkeit betreffen. In Deutschland hat keine der 2 Vakzinen ein Zulassungsverfahren durchlaufen.

Das mit dieser Arbeit vorgelegte Projekt hatte daher die Zielstellung, auf der Grundlage neuer Entwicklungen auf dem Gebiet der Impfstoffforschung Möglichkeiten zur Verbesserung der herkömmlichen Vakzinen zu prüfen.

Für die Testung von Vakzinekandidaten wurden drei Mausmodelle und ein Kaninchenmodell auf ihre Einsetzbarkeit zur Evaluierung von immunologischen Parametern und auf ihre Aussagekraft in Bezug auf die Protektivität der Immunantworten geprüft. Durch Etablierung entsprechender Negativ- und Positivkontrollen konnte gezeigt werden, daß sich das Infektionsmodell mit Sporen der Vakzine-Stämme STI oder Sterne in A/J-Mäusen gut für die Prüfung aller immunologischen Parameter während des Screenings von Vakzinekandidaten eignet, während für die Prüfung auf Protektivität das Auszuchtmausmodell und das Kaninchenmodell aufgrund der Möglichkeit einer Infektion mit vollvirulenten Sporen besser geeignet ist.

Unter Anwendung des in der vorgelegten Arbeit neu etablierten Auszuchtmausmodells sowie in Kaninchen wurde ein von der Firma EMC Microcollections GmbH Tübingen zu beziehendes Lipopeptid-Adjuvans (LP) im Vergleich zum in Deutschland einzigen am Menschen zugelassenen Adjuvans, Aluminiumhydroxid, bzw. im Vergleich mit der

Milzbrand-Humanvakzine (AVA) getestet. Der Vergleich der immunologischen und Infektionsversuchsdaten aus den Mäuseversuchen lassen das verwendete Lipopeptid als Adjuvans dem in den herkömmlichen Humanvakzinen enthaltenen Aluminiumhydroxyd oder Alum als überlegen erscheinen. Die in den Versuchen mit Kaninchen analysierten Parameter sowie die bei allen Immunisierungen erzielten 100 % Schutzrate lassen dagegen keinen Unterschied zwischen beiden Adjuvantien erkennen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß unter anderen Bedingungen, z. B. einer suboptimalen Antigenkonzentrationen und/oder höheren Infektionsdosen, das Lipopeptid auch in diesem Tiermodell das effektivere Adjuvans darstellt.

Die Versuche zur Immunisierung von Mäusen mit eukaryontischen Expressionskassetten in Form von gereinigter Plasmid-DNA wurden mit der in der Literatur beschriebenen Methodik für die intramuskuläre Injektion der DNA-Lösungen begonnen. Für spätere Versuche stand die Gen Gun (GG), ein Gerät zur intra- oder subkutanen Applikation von mit DNA beschichteten Goldpartikeln mit Hilfe einer Helium-Druckpistole, zur Verfügung. Orientierende Versuche im A/J-Mausmodell führten vektorabhängig zu Schutzraten von 57-100 %. Zur Verbesserung der Effektivität PA-basierender Vakzinekandidaten durch Kombination mit zusätzlichen Antigenen wurde erstmalig im Auszucht-Mausmodell eine neu entwickelte, für ein Sporenantigen (BclA) kodierende, Expressionskassette getestet. Nach der subkutanen Belastungsinfektion mit der 25fachen LD<sub>50</sub> vollvirulenter Sporen vom Stamm Ames überlebte die mit der Kombinationsvakzine immunisierte Versuchsgruppe als einzige signifikant besser als die Negativkontrolle. Das Ergebnis zeigt erstmalig die Möglichkeit, eine Auszucht-Mauslinie mittels DNA-Immunisierung gegen eine Infektion mit vollvirulentem *B. anthracis* zumindest partiell zu schützen. Die gleiche Kombination wurde in einem orientierenden Versuch erstmalig auch am Kaninchen getestet. Die Belastungsinfektion mit der 2000fachen LD<sub>50</sub> Ames-Sporen überlebten 2 von 3 Tieren, während in der Negativkontrolle alle Tiere nach 4 Tagen verstarben. Parallel zu den Untersuchungen in Kaninchen wurden zwei Plasmid-Kombinationen auf Immunogenität in Schafen sowie die Dauer der induzierten humoralen und zellulären Immunantwort getestet. Ein Ergebnis dieser Versuche war, daß bei der Titerbestimmung ca. 1 Jahr nach Immunisierungsbeginn der IgG-Titer der mit rPA + Aluminiumhydroxyd immunisierten Positivkontrollgruppe signifikant abgesunken war, während sich der Titer in einer der DNA-Vakzinegruppen nur unwesentlich verändert hatte. Die Schafe wurden keiner Belastungsinfektion unterworfen.

Die orale Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen führte in den beiden Mäuse-Inzuchtlinien zu sehr heterogenen Immunantworten gegen das PA, die vor allem durch die

Dominanz von Ak der Subklasse IgG2a und PA-spezifischen IFN $\gamma$ -Antworten geprägt waren. Die stärksten Immunreaktionen in Bezug auf antiPA spezifische Antikörper und IFN $\gamma$ -Bildung wurden nach Immunisierung mit prokaryontischen Expressionskassetten durch das plasmidal oder chromosomal integrierte Fusionsprotein erzeugt. Im Belastungsversuch mit der 100fachen LD<sub>50</sub> vom Stamm STI überlebten die mit einem dieser Vektoren immunisierten Gruppen signifikant besser als die Negativkontrollgruppe. Mit Immunisierungsraten von über 40 % und Schutzraten von 27,5 % für alle Versuchstiere bzw. 44 % für serokonvertierte Tiere lagen die insgesamt nach oraler Immunisierung von A/J-Mäusen erzielten Ergebnisse weit unter denen, die nach einer intravenösen (i.v.) Applikation der chromosomal integrierten Expressionskassette im Salmonellen-Impfstamm Zoosaloral H zu erzielen waren. Sie erreichten auch nicht die bereits mit DNA-Vakzinekandidaten bzw. mit rekombinanten Proteinvakzinen erzielten Ergebnisse. Andererseits zeigten die Versuche, bei denen ein 100 %iger Schutz gegen eine Infektion mit  $1 \times 10^6$  Sporen vom Stamm STI, nach i.v. Applikation erreicht worden war, die prinzipielle Möglichkeit, Tiere mit einem durch Salmonellen exprimierten PA83 erfolgreich zu immunisieren.

Für die Bewertung der immunologischen Daten war ihre Vorhersagekraft für den Ausgang der Infektionsversuche an Mäusen von Interesse. In keinem der 3 Immunisierungsmodelle, rPA mit Adjuvantien, DNA-Vakzine oder rekombinante Salmonellen, korrelierten die antiPA-ELISA Titer oder die Neutralisationstiter mit den Schutzraten. Beide haben daher keine prognostische Aussagekraft. Darin unterscheidet sich das Mausmodell offenbar von den für das Kaninchenmodell publizierten Annahmen. Zumindest in Mäusen scheint die humorale Immunität gegen die Toxine für das Überstehen der Infektion nicht von ausschlaggebender Bedeutung zu sein. Die Daten zu unterschiedlichen Schutzraten einer auf PA basierenden gegenüber einer gegen Lebendsporen gerichteten Immunität im Mausmodell, wie auch die partielle Schutzwirkung von Adjuvantien vor einer ansonsten tödlichen Infektionsdosis sowohl im Maus- wie im Kaninchenmodell, zeigen die Bedeutung der angeborenen Immunität für die erfolgreiche Bekämpfung einer Infektion mit Sporen von *B. anthracis* in beiden Tiermodellen. Künftige Vakzinen müssen daher verstärkt auf ihre Effektivität zur Aktivierung dieses Teils des Immunsystems hin evaluiert werden.

## Summary

Anthrax is of epidemiological importance as a zoonosis in man, which can cause fatal infections, and as well as being the reason for substantial losses in domestic and wild animal populations. Protection against *Bacillus anthracis* deserves particular attention considering it was proved to be an integral part of biological weapon programmes in a number of countries, and it has also been released during bioterrorist activities on several occasions. Additionally there are quite disconcerting published efforts of equipping *B. anthracis* with toxin encoding genes of other species, and with multiple antibiotic resistance cassettes that will seriously diminish the possibilities of treating an infection with antibiotics. On this background the need for research efforts answering immunological questions of prevention and therapy becomes obvious. An additional circumstance, to make efforts for the development of a vaccine in Germany, was the very limited availability of the two currently licensed human anthrax vaccines, which are produced in the U.S. and the United Kingdom. Both vaccines are not for public purchase and thus can hardly be obtained. Moreover, both vaccines have inherent disadvantages, concerning their efficacy as well as a series of side effects. Neither of the two vaccines is approved for use in Germany. The project summarised in this report had the aim to test possibilities of improving current vaccines on the basis of novel developments in the field of vaccine research.

Three different mouse models and a rabbit model, employed to test vaccine candidates, were examined with respect to feasibility to evaluate immunological parameters and their robustness with respect to protectivity and immune responses. By establishing appropriate negative and positive control systems, it could be shown that the infection model using STI spores and A/J mice is suitable for the study of immunological parameters while screening vaccine candidates. Issues of protectivity, however, favour the use of animal models using outbred mice and rabbits because they offer the possibility of infection with fully virulent *B. anthracis* spores.

Using the newly established outbred mouse model, as described in the present study, and using the rabbit infection model the effects of two different adjuvants complexed with the *B. anthracis* protective antigen (PA) were compared: a lipopeptide adjuvant (EMC Microcollections GmbH, Tübingen) and aluminium hydroxide, the only adjuvant licensed for humans in Germany. Additionally, the effects of the lipopeptide adjuvant and PA to AVA, the U.S. human anthrax vaccine were also investigated. Comparison of the immunological data and results from the challenge experiments in mice suggest that the lipopeptide adjuvant is superior to aluminium hydroxide or alum, which are currently in use in the human anthrax

vaccines. Otherwise the immunological parameters analysed in experiments with rabbits and also the 100 % protectivity rates for both, the lipopeptide adjuvant and aluminium hydroxide, show no difference between the two adjuvants in this animal model.. It cannot be excluded, however, that under different conditions, e.g. lower antigen concentrations and/or higher infection doses, lipopeptide would have been the more effective adjuvant in rabbits as well.

Experiments to immunise mice with purified plasmid DNA, carrying eucaryotic expression cassettes were started by intramuscular injection of the DNA solutions as described in the literature. For the following experiments a gene gun was available. This device uses helium pressure for the intra- or subcutaneous application of gold particles, which are coated with pDNA. Initial experiments using the A/J mouse model resulted in protectivity rates ranging between 57 % and 100 %, depending on the vector used. In order to improve the efficacy of PA-based vaccine candidates by combining them with additional antigens, a novel expression cassette encoding a spore antigen (BclA) was tested in the outbred mouse model for the first time. After subcutaneous infection with 25 LD<sub>50</sub> of fully virulent Ames spores, apart from positive control animals, the animal group vaccinated with this combination vaccine was the only one that survived significantly better than the negative control group. These data show for the first time the possibility to at least partially protect outbred mice against a lethal infection with fully virulent *B. anthracis* spores, using a DNA immunisation. The same plasmid DNA combination was also tested in rabbits. Two out of three animals survived a lethal infection with 2,000 LD<sub>50</sub> of Ames spores, while all animals of the negative control group died within 4 days. In parallel to the investigations performed in rabbits, two combinations of plasmids were also tested for their immunogenicity in sheep. Moreover, the duration of humoral and cellular immunoresponses was investigated, too. One result of these trials was the significant decline of the IgG-titer of the positive control group, immunised with rPA + aluminium hydroxyde as adjuvant., about 1 year after the first immunisation. At the same time the titer of one of the groups immunised with the DNA vaccine had not changed substantially. The sheep were not challenged.

The oral immunisation with recombinant *Salmonella* led to very heterogeneous immune responses against PA, which were dominated by antibodies of the IgG2a subclass and interferon- $\gamma$  responses. The strongest immune reactions with respect to PA-specific antibodies and induction of IFN- $\gamma$  were obtained after immunisation with prokaryotic expression cassettes encoding the fusion protein, either on the plasmid or integrated in the *Salmonella* chromosome. After challenge with 100 LD<sub>50</sub> of STI spores both groups, vaccinated with one of these vectors, survived significantly better than the negative control group. Results

obtained after oral vaccination of A/J mice, resulting in immunisation rates of 40 % and protectivity rates of 27.5 % for all animals and 44 % for seroconverted animals, were definitely not as good as the results after intravenous application of the chromosomally integrated expression cassette in the *Salmonella* vaccine strain Zoosaloral H. The results for oral vaccination with *Salmonella* also lagged behind results obtained after DNA vaccination or immunisation with recombinant protein vaccines. However, experiments resulting in 100% protectivity against a lethal infection with  $1 \times 10^6$  STI spores after i.v. application showed the basic possibility of successfully immunising animals with recombinant *Salmonella*, expressing PA.

The power to predict survival in the infection studies in mice was an important factor on the evaluation of the immunological data. None of the three immunisation models, rPA combined with adjuvants, DNA vaccination, or recombinant *Salmonella*, showed a correlation of anti-PA or toxin neutralisation titres and the rate of protectivity. Both parameters are therefore not suited for a prognosis of survival for mice. This appears to be one difference between the mouse models and the assumptions published for the rabbit model. At least for mice, the humoral immunity against the toxins does not seem to correlate with the survival of an infection. The data concerning differences in the protectivity rates of a PA-based immunity compared to the immunity induced by vaccination with live spores, emphasise the importance of the innate immunity to successfully fight an infection with *B. anthracis* spores. This notion is further supported by the observations of partial protection by adjuvants without PA against otherwise lethal anthrax infections in the mouse and the rabbit model as well. Future vaccines must, therefore, be evaluated by their efficacy to activate this part of the immune system.

## 1. Einleitung

Anthrax tritt als Krankheit endemisch in einer Reihe von Ländern Afrikas, Asiens und Südeuropas und in einem Teil Australiens auf. Aus vielen anderen Ländern sind sporadische Fälle bekannt. Hauptsächlich betroffen sind alle Pflanzenfresser, obwohl es wahrscheinlich keinen vollständig resistenten Warmblüter gibt. Die epidemiologische Bedeutung der Krankheit liegt zum einen in ihrer Eigenschaft, als Zoonose beim Menschen tödlich verlaufende Infektionen verursachen zu können, zum anderen verursacht sie erhebliche Verluste bei Nutz- und Wildtieren.

Besondere Aufmerksamkeit verdient der Schutz gegen *Bacillus anthracis* vor dem Hintergrund einer möglichen B-Waffen-Entwicklung. Berichte über militärische Forschungen sowie zur Entwicklung und Lagerung größerer Bestände entsprechend zubereiteter Kulturen des Erregers wurden aus einer Reihe von Ländern bekannt, darunter dem Irak und aus Nachfolgestaaten der ehemaligen Sowjetunion. Beunruhigend sind darüber hinaus publizierte Forschungsberichte zur Ausstattung von *B. anthracis* mit Toxin-Genen anderer Spezies (Arora und Leppla, 1994, Brossier et al., 2000) sowie mit multiplen Resistenzkassetten, die kaum noch eine Möglichkeit zur Behandlung einer Infektion mit Antibiotika offen lassen würden (Stepanov et al., 1996).

Die im Herbst 2001 durch die absichtliche Freisetzung von *B. anthracis* Sporen in den USA entstandene Krisensituation, von der auch Deutschland indirekt betroffen war, hat einen erhöhten Forschungsbedarf zu Fragen der immunologischen Prävention und Therapie dieser Erkrankung deutlich gemacht. Ein weiterer Grund, sich mit der Entwicklung einer eigenen Vakzine zu befassen, war die äußerst begrenzte Verfügbarkeit der beiden zur Zeit in England und in den USA hergestellten Humanvakzinen. Beide werden nicht frei gehandelt und sind deshalb nur schwierig zu beziehen. Darüber hinaus sind beide Vakzinen mit einer Reihe von Nachteilen behaftet, die sowohl ihre Effektivität als auch ihre Verträglichkeit betreffen.

Die der vorgelegten Arbeit zugrunde liegenden, durch das Bundesverteidigungsministerium geförderten Forschungsprojekte verfolgten die Zielstellung, auf der Grundlage neuer Entwicklungen auf dem Gebiet der Impfstoffforschung Möglichkeiten zur Verbesserung der herkömmlichen Vakzinen zu prüfen.

Die Ergebnisse der Arbeiten wurden in einer Vielzahl von Zeitschriftenartikeln, wissenschaftlichen Vorträgen und Posterbeiträgen sowie einer Reihe von Forschungsberichten publiziert.

## 2. Literaturübersicht

Der folgende Abschnitt enthält eine Übersicht zur historischen Entwicklung und zum heutigen Stand der Immunprophylaxe sowie zu neuen Ansätzen in der Entwicklung rekombinanter Anthrax-Vakzinen. Die Zusammenstellungen in den Tabellen 1 bis 3, Anhang II, sollen einen Überblick über die erzielten Schutzraten in Korrelation zu den verschiedenen Tier-, Immunisierungs- und Infektionsmodellen aus den wichtigsten Publikationen seit 1986 geben (siehe auch Beyer, 2004).

### Entstehung und Stand der heute verwendeten Anthrax-Vakzinen

Anthrax ist eine durch den Erreger *Bacillus anthracis* hervorgerufene Infektionskrankheit von Tieren und Menschen (Koch, 1876) und gehört zu den ersten mittels einer Immunprophylaxe behandelten bakteriellen Krankheiten. Pasteur und Greenfield immunisierten erstmalig landwirtschaftliche Nutztiere durch die zweifache Verabreichung von Kulturen vegetativer Bazillen (Pasteur, 1881; Tigertt, 1980). Den „Impfstoff“, eine offensichtlich attenuierte Variante von *B. anthracis*, hatte Pasteur durch eine verlängerte Kultivierung der Erreger bei erhöhter Temperatur gewonnen, ob ursprünglich beabsichtigt oder zufällig sei dahingestellt. Die Ursache der Attenuierung blieb rund 100 Jahre im Dunkeln, bis Mikesell et al. (1983) zeigen konnten, daß die Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 42 °C zum partiellen Verlust des toxinkodierenden Plasmids, heute als pXO1 bezeichnet, führt. Die von Pasteur verwendete Kultur enthielt demnach eine Mischung aus Toxin produzierenden und nicht produzierenden Bazillen und verfügte daher über eine erhebliche und von Kultur zu Kultur variierende Restvirulenz (Preis, 1911).

Da mit dem Verlust des Toxin kodierenden Plasmids gleichzeitig das protektive Hauptantigen (PA) von *B. anthracis* verloren geht, setzte sich der später von Sterne isolierte, Toxin positive und Kapsel negative Stamm 34F2 ( $\text{tox}^+$ ,  $\text{cap}^-$ ) weltweit als Lebendimpfstamm für die Immunisierung von Tieren durch (Sterne, 1937; Sterne et al., 1942). Dieser Stamm produziert neben dem Schutzfaktor (PA) die Toxinkomponenten Letalfaktor (LF) und Ödemfaktor (EF) in aktiver Form, ihm fehlt jedoch das für die Kapselbildung kodierende Plasmid pXO2. Da vollvirulente Stämme immer beide Plasmide tragen, gilt der Stamm 34F2 als attenuiert, obwohl eine signifikante Restvirulenz in Labortieren (Sterne, 1939; Cartwright et al., 1987; Turnbull et al., 1986; Welkos und Friedlander, 1988) und domestizierten Tieren (Turnbull, 1991) nachweisbar ist. Ein genetisch ähnlicher Stamm, mit STI-1 bezeichnet, wurde 1953 in der Sowjetunion für den Einsatz zur Impfung von Menschen lizenziert (Shuylak, 1970; Shlyakhov und Rubinstein, 1994).

Nachdem bereits frühe Studien zum Schutz von Tieren durch Übertragung von Ödemflüssigkeit (Bail, 1904; Salsbery, 1926) auf einen löslichen Faktor als protektives Prinzip hindeuteten, demonstrierte Gladstone (1946) erstmalig das Vorkommen eines „Protektiven Antigens“ in Kulturüberständen von *B. anthracis*. Aus diesen Arbeiten resultierte in den 1950er und 1960er Jahren die Entwicklung der noch heute in England (Belton und Strange, 1954; Lincoln und Fish, 1970) und in den USA (Whright et al., 1954; Auerbach und Whright, 1955; Puziss und Whright, 1962; Puziss et al., 1963) verwendeten Protein-Vakzinen. Die US amerikanische Vakzine AVA (Anthrax Vakzine Adsorbed) wurde 1970 durch die Food and Drug Administration zugelassen. Sie besteht aus dem an Aluminiumhydroxid (Ah) adsorbierten Überstand einer Flüssigkultur (synthetisches Medium) des Stammes V770-NP1-R (tox<sup>+</sup>, cap<sup>-</sup>), der im wesentlichen PA als Antigen enthält. Zusätzlich werden Formaldehyd als Stabilisator und Benzethoniumchlorid zur Konservierung zugesetzt (Puziss und Whright, 1962). Die Kultivierung des für die 1979 in England lizenzierte Vakzine (AV-UK) benutzten Sterne-Stammes 34F2 erfolgt in einer statischen Kultur, mit einem Proteinhydrolysat als Medium (Turnbull, 2000; Baillie et al., 2003). Der Überstand wird mit Aluminium-Kaliumsulfat (Alum) präzipitiert und mit Thiomersal konserviert. Interessanterweise induziert diese Vakzine einen höheren Antikörper (Ak)-Titer gegen LF als die Impfung mit AVA. Die protektiven Eigenschaften beider Vakzinen sind jedoch sehr ähnlich (Turnbull et al., 1986, 1988). Beide Vakzinen werden in 0,5 ml Dosen verimpft, AVA subcutan (s. c.), AV-UK intramuskulär (i. m.). Während für AVA 6 Immunisierungen nach dem Zeitschema 0-2-4 Wochen, 6 und 18 Monate erforderlich sind (Brachman und Friedlander, 1999), kommt AV-UK mit 4 Immunisierungen (0-3-6 Wochen und 6 Monate) aus (Vakzine-Begleitschein, HPA, Porton Down, Salisbury). Für beide Vakzinen sind jährliche Boosterungen vorgeschrieben. Beide Vakzinen waren ursprünglich für einen begrenzten Einsatz an Personen mit erhöhtem Infektionsrisiko (landwirtschaftliches Personal in Risikogebieten; tierische Rohstoffe wie Häute, Wolle, Knochen verarbeitende Industrie und Laborpersonal) vorgesehen. Seit 1998 werden jedoch auch Teile der US-Armee zum Schutz gegen den vermuteten Einsatz von *B. anthracis* in einer Biowaffe immunisiert (Friedlander et al., 1999) und in einigen europäischen NATO-Staaten sind entsprechende Impfprogramme in Vorbereitung. Da es aus ethischen Gründen keine experimentellen Daten über die Belastbarkeit oder die Dauer der Immunität beim Menschen gibt, stützen sich Aussagen dazu vor allem auf die bislang einzige kontrollierte epidemiologische Studie aus den Jahren 1955-58 (Brachman et al., 1962). Die Autoren berichten über einen 93 %igen Schutz einer immunisierten Gruppe von Arbeitern einer Ziegenhaar-Spinnerei in den USA. In

dieser Gruppe erkrankte 1 Person an Hautmilzbrand, während in der Placebo-Kontrollgruppe 13 Personen an Haut- und 2 Personen an Lungenmilzbrand erkrankten. Drei weitere Lungenmilzbrandfälle in der Placebo-Gruppe wurden aufgrund des Ausscheidens der Personen aus dem Versuch nicht gewertet. In jüngerer Zeit konnte in Versuchen an im Labor gehaltenen Kaninchen und Rhesusaffen die hohe Wirksamkeit von AVA nachgewiesen werden (Ivins et al., 1998; Pitt et al., 1996a, b, 1999; Fellows et al., 2001). Gleichzeitig ist jedoch bekannt, daß Meerschweinchen mit AVA nur partiell gegen eine parenterale und kaum gegen eine Aerosol-Infektion zu schützen sind (Ivins et al., 1992, 1994, 1995; Fellows et al., 2001). Mäuse und Hamster sind nach der Immunisierung mit AVA nicht gegen eine Infektion mit vollvirulentem *B. anthracis* gefeit (Fellows et al., 2002; Welkos et al., 1990; Ivins et al., 1992). Insbesondere Mäuse gelten als extrem sensitiv für die Infektion, da bei ihnen selbst ein nicht Toxin produzierender, aber bekapselter Stamm zu tödlich verlaufenden Infektionen führen kann.

Weiter zu nennende Nachteile der lizenzierten Proteinvakzinen sind die Schwankungen in der Zusammensetzung des verwendeten Kulturüberstandes, insbesondere der Konzentration sowohl des Hauptantigens (PA) als auch der Begleitproteine (insbesondere LF und EF), des weiteren die unbekannte Dauer des Immunschutzes und eine Reihe von klinisch relevanten Nebenwirkungen wie lokaler Schmerz und Entzündung der Impfstelle, Fieber und Unwohlsein (CDC, 2000).

### Pathogenese der Milzbrandinfektion

Um die Wirkungsweise immunprophylaktischer oder auch immuntherapeutischer Maßnahmen gegen Anthrax verstehen zu können, sind Kenntnisse über die Pathogenese der Krankheit erforderlich.

Für die Pathogenese von Milzbrand ist die Interaktion der Erreger mit den Wirtsmakrophagen von entscheidender Bedeutung. Die Infektion erfolgt auf natürlichem Weg über die intradermale Inokulation, die orale Aufnahme oder durch die Inhalation von Sporen. Unter den verschiedenen Infektionswegen bildet die Aerosolinfektion für den Menschen die gefährlichste Form, da sie unbehandelt in der Regel zum Tod führt (Fritz et al., 1995; Zaucha et al., 1998). Die pulmonale Infektion führt, wie auch für alle anderen Infektionswege möglich, über mehrere Stufen zur generalisierten Ausbreitung des Erregers, einer Septikämie mit anschließender Organmanifestation, die sich als Lymphadenitis, Pneumonie, Mediastinitis, Peritonitis, Meningitis und schließlich multiples Organversagen äußert. Die Patienten sterben in einem hypotensiven Schockzustand, der pathohistologisch durch mit

fibrinösen Bakterienmassen verstopfte Kleingefäße und massive Leukozytose mit Linksverschiebung gekennzeichnet ist (Zauchá et al., 1998; Vasconcelos et al., 2003). Nach Inhalation können die Sporen die tiefen Bronchioli und Alveolen erreichen, wo sie von Alveolarmakrophagen phagozytiert werden (Guidi-Rontani et al., 1999). Die sporenbeladenen Makrophagen migrieren zu den regionalen Lymphknoten (Lkn), inklusive der mediastinalen Lkn und von da via *Ductus thoracicus* in den Blutstrom. Nach Erreichen des Blutstroms vermehren sich die Erreger stetig und können Werte von  $10^7$ /ml (Kaninchen, Bloom et al., 1947) oder  $10^9$ /ml (Meerschweinchen, Smith und Keppie, 1954) erreichen. Gewebeerstörungen in lokalen Lkn können zur direkten Infektion des umliegenden Gewebes führen. Die Germination der Sporen erfolgt in den Makrophagen (Guidi-Rontani et al., 1999). Die für die Germination notwendigen Bedingungen variieren in den Zellen verschiedener Spezies bzw. Tierlinien und sind eine Ursache für die unterschiedlich hohe Resistenz gegenüber Anthrax (Guidi-Rontani und Mock, 2002; Popov et al., 2002). Ein bislang beschriebenes Operon für die Germination von *B. anthracis* (*gerX*) ist auf dem Virulenzplasmid pXO1 innerhalb einer Pathogenitätsinsel lokalisiert, die durch invertierte Sequenzwiederholungen begrenzt wird und auch die Gene für die Toxine (*pagA*, *lef*, *cya*) sowie die Toxin-Regulatoren *atxA* und *pagR* (Uchida et al., 1993; Koehler et al., 1994; Hoffmaster und Koehler, 1999a, b) enthält. Weitere Germinations-Operons befinden sich auf dem Chromosom (Guidi-Rontani et al., GenBank AN.: AF182371). Der Germination der Sporen im Makrophagen folgt die schnelle Bildung der Toxine (Guidi-Rontani et al., 1999). Verkapselte vegetative Zellen erscheinen bereits innerhalb von 30 min nach der Germination *in vitro* (Ezzell und Welkos, 1999).

Es wird angenommen, daß Makrophagen auch die entscheidenden Zielzellen für die Wirkung des Letaltoxins (Ltx) darstellen, da Mäuse nach Depletion ihrer Makrophagen mit Kieselsäure resistent gegen eine letale Dosis von Ltx waren (Hanna et al., 1993). *In vitro* ist Ltx innerhalb von 90-120 min. lytisch für eine Reihe primärer Mausmakrophagen sowie für die transformierten Mausmakrophagen-Zelllinien RAW264.7 und J774A.1 (Singh et al., 1989). Frisch isolierte humane, periphere mononukleäre Blutzellen sind dagegen resistent gegenüber der Toxinwirkung, solange sie nicht durch Stressfaktoren wie Interferon Gamma ( $IFN\gamma$ ) oder Serumentzug aktiviert werden (Popov et al., 2002). Obwohl Ltx auch von anderen Zelltypen internalisiert wird, scheinen diese nicht von der Wirkung betroffen zu sein (Friedlander, 1986, Singh et al., 1989; Friedlander et al., 1993). Das Letaltoxin erzeugt in Makrophagen eine Kaskade von Veränderungen, an deren Ende die Lyse der Zelle steht (Hanna et al., 1992). *In vivo* scheint es sich dabei um einen apoptotischen Absterbeprozess zu handeln (Popov et al.,

2002). Caspase-Inhibitoren vermitteln eine signifikante Schutzwirkung (Popov et al., 2004). Der Letalfaktor ist eine zinkabhängige Metalloprotease. Als intrazelluläre Substrate sind bislang nur die Mitogen aktivierten Protein-Kinase-Kinasen MAPKK beschrieben, die durch einen Schnitt am N-terminalen Ende inaktiviert werden (Duesbery und v. d. Woude, 1999b; Vitale et al., 1999; Pellizzari et al., 1999). Der Zusammenhang zwischen der Inaktivierung eines Teils der Signalkaskade für extrazellulär signalregulierte Kinasen und der lytischen Wirkung von Ltx sowie die pathophysiologische Konsequenz dieser Wirkungen ist jedoch nicht endgültig aufgeklärt (Pellizzari et al., 2000; Vitale et al., 2000). Die Inaktivierung verhindert, zumindest *in vitro*, die Aktivierung der in der Signalkaskade am Ende stehenden Transkriptionsfaktoren und damit die Expression von Chemokin- und Zytokingenen (Erwin et al., 2001; Park et al., 2002). In früheren Arbeiten war die vermehrte Bildung von inflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffradikalen und deren massive Freisetzung aus Makrophagen während der Infektion für den finalen hypotensiven Schockzustand verantwortlich gemacht worden (Abramova et al., 1993; Hanna et al., 1994). Heute geht man davon aus, daß die Unterdrückung der inflammatorischen Antwort im Makrophagen durch das Letaltoxin die unkontrollierte Vermehrung des Erregers ermöglicht, welche dann in der finalen Phase der Infektion zu den klinisch apparenten massiven Entzündungserscheinungen führt (Popov et al., 2004).

#### Rekombinantes Protektives Antigen (PA), das Hauptantigen von *B. anthracis*

PA wird von der vegetativen Zelle sekretiert und bindet an zelluläre Rezeptoren, die kürzlich als „splice“ Varianten des „Tumor Endothelialen Markers 8“, TEM8 (Bradley et al., 2001; Liu und Leppla, 2002) oder des verwandten „Kapillären Morphogenese Proteins 2“, CMG2 (Scobie et al., 2003), charakterisiert wurden. Nach proteolytischer Prozeption, wobei durch eine zellständige Protease vom 83,5 kDa großen Vorläuferprotein ein aminotermiales 20 kDa großes Peptid (PA20) abgespalten wird (Klimpel et al., 1992), bildet das verbleibende 63 kDa große Fragment (PA63) eine aus 7 Untereinheiten bestehende Ringstruktur, die kompetitiv LF oder EF bindet (Duesbery und v. d. Woude, 1999a; Petosa et al., 1997; Benson et al., 1998; Rosovitz et al., 2003). Diese Komplexe werden durch rezeptorvermittelte Endozytose in membranumschlossene Vesikel aufgenommen (Beauregard et al., 2000; Abrami et al., 2003). Nach Ansäuerung des Endosoms integriert die Ringstruktur in die Vesikelwand. Durch die gebildete Pore werden die aktiven Enzymkomponenten ins Zytoplasma entlassen (Petosa et al., 1997), siehe Abb. 1. Bei EF handelt es sich um eine Adenylatzyklase (Leppla, 1982), LF ist eine Zink-Metallprotease mit proteolytischer Wirkung

auf Proteinkinase-Kinasen, MAPKK (Duesbery und v. d. Woude, 1999b). Die 3 Einzelkomponenten sind für sich allein nicht toxisch. Das PA Protein läßt sich in 4 funktionelle Domänen unterteilen (Petosa et al., 1997), siehe Abb. 2. Domäne 1 mit den Aminosäure- (AS) Resten 1-258 enthält den Protease-Schnittort und einen hydrophoben Anteil von PA, der nach Entfernung des 20 kDa Fragments den Bindungsort für EF und LF freigibt (Petosa et al., 1997). Domäne 2 (AS-Reste 259-487) ist in die Oligomerisation involviert und stellt die AS-Schleife zur Verfügung, mit der die Ringstruktur in die Membran der Vesikelwand integriert (Nassi et al., 2002). Weitere Aminosäuren der Domäne 3 (AS-Reste 488-595) sind ebenfalls für die Oligomerisation notwendig (Ahuja et al., 2001). Domäne 4 (AS-Reste 596-735) ist für die Bindung an den zellulären Rezeptor essentiell (Brossier et al., 1999; Varughese et al., 1999).

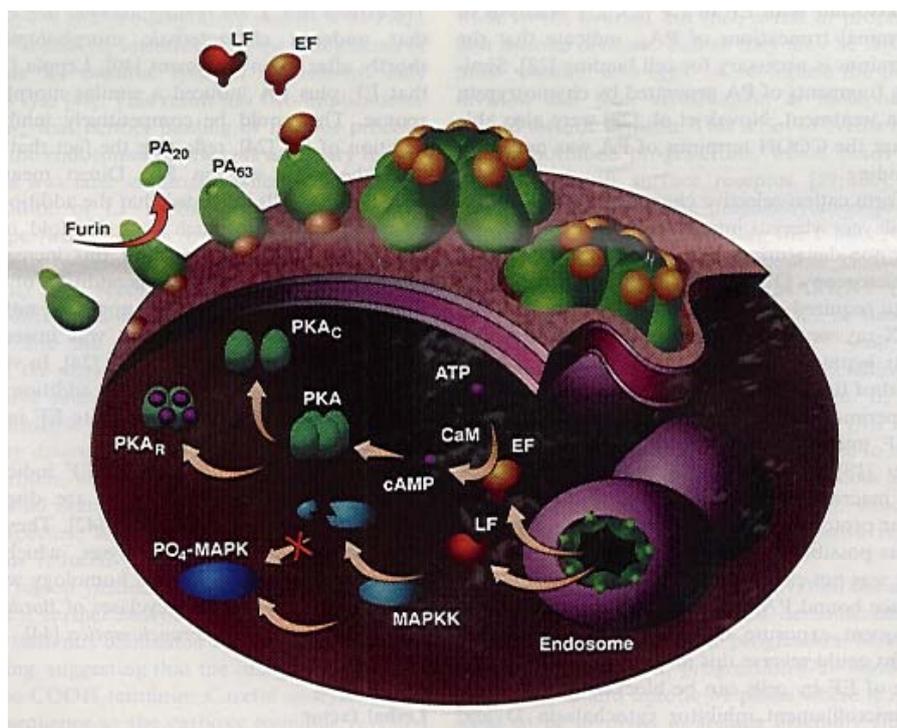


Abb. 1: Mechanismus der Zellintoxikation durch die Toxine von *B. anthracis* entnommen aus: Duesbery und Vande Woude, CMLS (1999a).

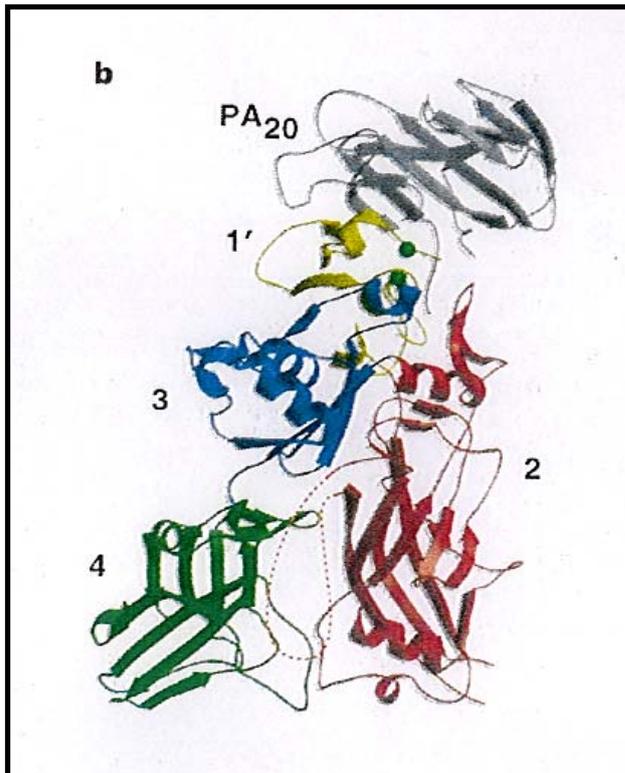


Abb. 2: Schema der Kristallstruktur des PA83 Proteins, entnommen aus : Petosa et al., Lett. Nat. (1997).

Das abgespaltene Fragment PA20 ist nicht protektiv (Ivins und Welkos, 1988). Auf dem verbleibenden PA63 gelten die Bindungsstellen für EF und LF bzw. für den Zellrezeptor als wichtige Ziele für die neutralisierende Aktivität von Antikörpern (Little et al., 1996, 1997; Singh et al., 1991; Varughese et al., 1999). Für eine protektive Immunantwort scheinen jedoch die gegen die Bindungsstelle für EF und LF gerichteten Ak keine entscheidende Rolle zu spielen, da Proteinmutanten mit deletierter Schnittstelle für die Abspaltung von PA20 ebenfalls schützende Wirkung haben (Singh et al., 1998). Wahrscheinlich tragen auch bislang nicht charakterisierte Epitope auf anderen Domänen, die für die Oligomerisierung des PA und dessen Translokation in die Zelle verantwortlich sind, zur humoralen Immunität bei (Novak et al., 1992; Singh et al., 1999).

Nachdem Mikesell et al. (1983) die Toxingene auf dem Plasmid pXO1 lokalisiert hatten und Welkos et al. (1988) die Sequenz des PA veröffentlichten, konnte im folgenden das Protein rekombinant hergestellt werden. Die Klonierungen erfolgten vorwiegend in *E. coli* (Vodkin und Leppla, 1983; Coulson et al., 1994, Benson et al., 1998; Gupta et al., 1999; Hahn et al., 2004), aber auch in *B. subtilis* (Ivins und Welkos, 1986) und *B. brevis* (Oh et al., 1998).

Die Reinigung von rekombinantem PA aus *B. anthracis* zur Immunisierung wurde ebenfalls beschrieben (Singh et al., 1998). Ramirez et al. (2002) verwendeten den Protease defizienten,

avirulenten Stamm (BH445, pXO1<sup>-</sup>, pXO2<sup>-</sup>, Cm<sup>r</sup>) für die großtechnische Produktion von rekombinantem PA.

Ein aus *B. subtilis* isoliertes, rekombinantes PA induzierte als Protein-Vakzine in Verbindung mit verschiedenen Adjuvantien im Meerschweinchenversuch Schutzraten bis zu 100 %. Dabei wurden abhängig vom Adjuvans Unterschiede in der Art der Immunantwort, bezogen auf IgG-Subklassen und Lymphozytenproliferation, festgestellt (Miller et al., 1998; McBride et al., 1998).

#### Rekombinante Vakzinen auf der Basis von *B. subtilis* und *B. anthracis*

Die Klonierung des PA-Gens in *B. subtilis* und die Testung dieser Rekombinante in Tierversuchen zeigte erstmals, daß PA als alleiniges Antigen in der Lage ist, protektive Immunantworten zu induzieren. Rekombinantes PA exprimierende *B. subtilis* waren für Meerschweinchen völlig avirulent ( $10^9$  Sporen) und induzierten Schutzraten bis zu 100 % (Ivins und Welkos, 1986; Welkos und Friedlander, 1988). Selbst Mäuse konnten gegen eine Infektion mit vollvirulentem *B. anthracis* zu 70 % geschützt werden (Ivins et al., 1990; Welkos et al., 1990). Nach Übertragung der rekombinanten Expressionskassette aus *B. subtilis* in einen Toxin negativen Sterne-Stamm,  $\Delta$ Sterne-1 (pPA102, Farchaus et al., 1998), wurde im weiteren eine asporogene Variante isoliert, die gegenwärtig als Produktionsstamm für rekombinantes PA zur Entwicklung einer neuen Protein-Vakzine in den USA eingesetzt wird (Worsham und Sowers, 1999).

Neben *B. subtilis* wurden vorwiegend rekombinante *B. anthracis* Stämme auch als Lebendvakzinen getestet. Mit im aromatischen AS-Stoffwechsel defekten Mutanten konnten dabei sowohl Mäuse als auch Meerschweinchen zu 80 % bzw. 100 % geschützt werden (Ivins und Welkos, 1988; Ivins et al., 1990). Für die Untersuchung der Fragestellung, in welchem Ausmaß die Toxinfaktoren LF und EF zur Virulenz von Sporen und zur Immunogenität und Protektivität von Impfstoffen beitragen, wurden in der Arbeitsgruppe um M. Mock am Institut Pasteur eine Reihe von Toxin-Mutanten des Sterne-Stammes konstruiert (Pezard et al., 1991, 1993, 1995). Dabei erwiesen sich die nur PA und LF oder nur PA und EF exprimierenden Varianten als weniger virulent als der Sterne-Elternstamm. Erstere waren jedoch noch immer letal für Mäuse (Cataldi et al., 1990; Pezard et al., 1991), während letztere nur noch Hautödeme verursachten. Die Befunde unterstützten die bereits aus Versuchen mit partiell gereinigten Toxinkomponenten stammenden Erkenntnisse über die Zuordnung der klinischen Symptome zu den Virulenzfaktoren (Smith und Stoner, 1967). Mutanten, die jeweils nur eine Toxinkomponente, PA oder LF oder EF, exprimierten, waren avirulent im Mausversuch

(Pezard et al., 1993). Auch diese Daten stützen frühere Versuche mit gereinigten Proteinen von Cataldi et al. (1990). Mit den nur einzelne Komponenten exprimierenden Stämmen war die Möglichkeit gegeben, den Anteil jeder Komponente an der Immunogenität der Toxinkomplexe zu prüfen. Der PA exprimierende Stamm induzierte hohe anti-PA Antikörperantworten. Nur EF- oder LF-exprimierende Stämme erzeugten kaum meßbare spezifische Antworten. Jedoch wurden nach Kombination von EF oder LF mit PA hohe ELISA-Titer gegen EF bzw. LF gemessen (Pezard et al., 1995). Offensichtlich wirkte hier PA wie ein Adjuvans. Wie Brossier et al. (2000) zeigen konnten, ist für die Immunogenität von EF und LF deren Kopplung an die PA-Bindungsstelle erforderlich, nicht aber die Bindung des Komplexes an den Zellrezeptor. Ob jedoch durch die Kopplung von PA an eine der Enzymkomponenten tatsächlich auch die Protektivität einer Toxoid-Vakzine gesteigert werden kann, bleibt aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse bis heute umstritten. Brossier et al. (1999, 2000) gelang die Herstellung funktionsloser Toxin-Mutanten des Sterne-Stammes ohne Insertion von Fremd-DNA (Vektor-DNA, Resistenzkassetten), die jedoch die volle Immunogenität der Toxin-Komponenten besitzen. Diese Mutanten konnten Mäuse zu 100 % gegen eine Infektion mit 40 LD<sub>50</sub> eines vollvirulenten *B. anthracis* Stammes schützen und gelten als vielversprechende Vakzine-Kandidaten.

Barnard und Friedlander (1999) führten Versuche zur Immunogenität eines für beide Plasmide negativen *B. anthracis* (*tox*<sup>-</sup>, *cap*<sup>-</sup>) durch, in den ein rPA exprimierender Plasmidvektor kloniert worden war. In Meerschweinchen und Mäusen, für die dieser Stamm im Gegensatz zu herkömmlichen Sterne-Vakzinen auch in hohen Dosen nicht virulent war, korrelierte die Protektivität mit der Höhe der anti-PA ELISA-Titer und diese wiederum mit der Höhe der PA-Expression *in vitro*.

Ähnliche Versuche mit einem PA-Gen unter Kontrolle eines  $\alpha$ -Amylase-Promotors aus *B. amyloliquefaciens* in einem doppelt negativen und Protease defizienten Stamm verbesserten nochmals die PA-Expression und damit die Protektivität für Meerschweinchen (Cohen et al., 2000).

#### Versuche zur oralen Immunisierung mittels bakterieller Lebendvakzine

Die orale Anwendung bisher bekannter Lebendvakzinen von *B. anthracis* erscheint aus verschiedenen Gründen zweifelhaft. Zum einen ist wegen der fehlenden Invasivität nur eine unzureichende Aktivierung der für die Immunität bedeutsamen zellvermittelten Abwehr zu erwarten (Turnbull et al., 2001). Zum anderen erscheint nach den Erfahrungen mit den Folgeereignissen der bioterroristischen Anschläge in den USA die Verbreitung von Anthrax-

Impfsporen nicht wünschenswert, auch wenn diese aufgrund ihrer Attenuierungen, zumindest auf natürlichem Wege, nicht in den Infektionskreislauf zurückkehren würden. Ihre Anreicherung in der Umwelt könnte zu vermehrten zufälligen Nachweisen führen, die in der Folge nicht nur eine aufwendige Abklärung erfordern würden sondern auch die unnötige Alarmierung ziviler und militärischer Abwehr-Institutionen zur Folge hätte, insbesondere in Gebieten, in denen der Erreger nicht endemisch vorkommt. Vor diesem Hintergrund werden derzeit andere bakterielle Lebendvakzinen für die orale Anwendung geprüft.

Der Einsatz von rPA exprimierenden Laktobazillen als oraler Impfstoff wurde von Zegers et al. (1999) getestet. Das Protein wurde allerdings nur in geringen Mengen gebildet. Eine belastbare Immunität konnte damit nicht erreicht werden.

Coulson et al. (1994) publizierten erstmalig Impfversuche mit einem rPA-exprimierenden *S. enterica* Serovar Typhimurium, Stamm SL3261. Nach der Immunisierung von Balb/c Mäusen konnten die Autoren selbst nach intravenöser (i. v.) Applikation der Salmonellen keine anti-PA Antikörper nachweisen. Der Grund dafür könnte in einer schwachen Expression von PA *in vivo* gelegen haben, da die Expressionskassette in einem Plasmidvektor (pUC) integriert vorlag, der sowohl den *plac*-Promotor als auch den diesen hemmenden *laqI<sup>d</sup>*-Repressor enthielt. Darüber hinaus ist die hohe Instabilität dieses Vektortyps bekannt. Dennoch war ein Teil der Tiere (6 von 16) vor einer Belastungsinfektion geschützt.

Die Möglichkeit der effektiven Präsentation von Protein-Antigenen durch Verwendung lebender, attenuierter Salmonellen wurde vielfach beschrieben (Curtiss et al., 1988a, 1989, 1990, 1994; Cardenas und Clements, 1993; Hormaeche und Khan, 1996; Darji, 1997).

Stabil attenuierte *Salmonella*-Lebendimpfstämme, darunter bevorzugt Auxotrophie-Mutanten mit Defekten im Kohlehydrat-Stoffwechsel, *galE* (Germanier und Furer, 1971, 1975) oder im aromatischen AS-Stoffwechsel, *aroA* (Hoiseh und Stocker, 1981; Dougan et al., 1987) sowie die von Curtiss und Kelly (1987) entwickelten Stämme mit Deletionen im Adenylatzyklase-Gen (*cya*) und im cAMP-Rezeptorprotein-Gen (*crp*) werden seit vielen Jahren als Vektoren zur Präsentation von Fremdantigenen im Labor getestet. Corthesy-Theulaz et al. (1998) beschrieben erstmals den Einsatz einer *phoP*-Mutante von Typhimurium als Antigen-Carriersystem. Zhang et al. (1997b) testeten erfolgreich eine  $\Delta crp\Delta cdt$ -Mutante, die von Kelly et al. (1992) erstbeschrieben wurde. Der  $\Delta cdt$ -Marker (colonization of deep tissues) stellt eine Erweiterung der Deletion des *crp*-Gens dar und führte zu attenuierten aber dennoch hoch immunogenen *Salmonella*-Stämmen, die die Fähigkeit zur Infiltration innerer Organe wie Leber und Milz verloren hatten.

Zu den getesteten Fremdartigen gehören bakterielle Oberflächenproteine, wie Außenmembran-Proteine (Formal et al., 1981; Tramont et al., 1984; Black et al., 1987; Baron et al., 1987; Poirier et al., 1988; Curtiss et al., 1988b; Nakayama et al., 1988; Tarkka et al., 1989; Stabel et al., 1990, 1993; Leslie et al., 1993; Dunne et al., 1995; Redman et al., 1996), Fimbrienproteine, darunter spezielle Adhäsine (Stevenson und Manning, 1985; Hone et al., 1989; Dougan et al., 1986; Hajishengallis et al., 1996), Kapselantigene (Titball et al., 1997; Leary et al., 1997), Toxinkomponenten (Clements et al., 1986; Maskell et al., 1987; Fairweather et al., 1990; Strugnell et al., 1990; Hajishengallis et al., 1996; Orr et al., 1999) sowie bakterielle Enzyme (Corthesy-Theulaz et al., 1998; Fagan et al., 1997); parasitische Oberflächenantigene, wie das SREHP von *Entamoeba histolytica* (Cieslak et al., 1993; Zhang und Stanley, 1997a) und das zirkumsporozoite Antigen von *Plasmodium falciparum* (Sadoff et al., 1988) und ein Lipoprotein von *Treponema pallidum* (Strugnell et al., 1990) sowie virale Proteine der Virusoberfläche bzw. aus dem Virus-core (Charbit et al., 1993; Schödel et al., 1993; Fouts et al., 1995; Tijhaar et al., 1997) und das TK-Gen von HSV (Pawelek et al., 1997).

Die publizierten Daten zum Typ der jeweils induzierten Immunantwort sowie zur Korrelation zwischen Immunantwort und Protektivität sind äußerst fragmentarisch. Die Erfolge der Immunisierung erscheinen jedoch durchaus unterschiedlich. Dabei haben offensichtlich Faktoren wie die Art der Attenuierung des verwendeten Vakzinestammes und das Applikationsschema, d. h. der Weg der Applikation und die Anzahl der Impfungen und Bakterienzahl, den größten Einfluß (als Beispiele siehe Dunstan et al., 1998, für den Vergleich der Immunogenität und Protektivität verschieden attenuierter Vakzinestämme und Karem et al., 1995, für den Vergleich der oralen zur i. v. Applikation einer Carrier-Vakzine).

Ihre besondere Eignung zur Verwendung als Vektoren zur Präsentation von Fremdartigen und damit für die Entwicklung rekombinanter Vakzinen ist durch den Pathogenese-Mechanismus und verbunden damit durch die Art und Weise der Kontaktaufnahme zwischen Bakterien und immunkompetenten Zellen begründet. *Salmonella spp.* sind fakultativ intrazelluläre Pathogene (Finlay und Falkow, 1989). Nach einer Phase der Adhäsion an das Follikel-assoziierte Darmepithel (FAE) der Peyerschen Platten (PP), dringen die Bakterien aktiv vorwiegend in die das FAE durchsetzenden M-Zellen ein (Lee und Schneewind, 1999; Scherer et al., 2000; Winstanley und Hart, 2001). Nach Transzytose durch die M-Zellen gelangen sie in das darmassoziierte lymphoretikuläre Gewebe (GALT), ein ähnlich den Lymphknoten strukturiertes Gewebe mit aus follikulären dendritischen Zellen (DCs) und

immaturen B-Zellen aufgebauten Germinalszentren und der darüber liegenden „Dom“-Region, die reich an DCs, Makrophagen, B- und T-Zellen ist. Hier erfolgt die Phagozytose durch professionell Antigen präsentierende Zellen (APCs), d. h. Makrophagen (Jones et al., 1994; Jones und Falkow, 1996) und dendritischen Zellen (Hopkins et al., 2000; Marriott et al., 1999). Die DCs können mit ihren prozessierten Antigenen T-Helferzellen (Th) und zytotoxische T-Zellen (CTL) im lokalen lymphoretikulären Gewebe aktivieren oder sie migrieren in regionale Lymphknoten. B-Zellen, die durch den Kontakt mit einem Antigen und einer Th-Zelle aktiviert wurden, migrieren in die folliculären Germinalszentren, wo es zu Affinitätsreifung und einer durch Zytokine der Th-Zellen gesteuerten Ig-Klassenänderung zu IgA und IgG kommt. Nachdem aktivierte B- und T-Zellen in dieser Region einen mukosalen „homing“ Rezeptor erworben haben, gelangen sie via die Lymphe in den Blutstrom und können sich dann in den als Effektor-Orte bezeichneten Regionen der Laminae propriae absiedeln. B-Zellen differenzieren dort zu Antikörper, vorwiegend sekretorisches IgA, produzierenden Plasmazellen. Dieses Zusammenspiel von Induktionsorten, zu denen funktionell neben dem GALT auch das nasal- und rektalassozierte lymphoretikuläre Gewebe gehören, und Effektor-Orten ist unter dem Begriff Common Mucosal Immunsystem (CMIS) bekannt (Lavelle et al., 1995; McGhee et al., 1994), siehe Abb. 3. Darüber hinaus gelangen Salmonellen in innere Organe, insbesondere Milz und Leber (für eine Übersicht zur Funktionsweise des Schleimhaut-Immunsystems sowie der molekularen Pathogenese von Salmonellen siehe: Kaufmann et al., 2002; Hacker und Heesemann, 2002).

Die Interaktion von lebenden Salmonellen mit APCs Zellen zeichnet sich durch einige Besonderheiten aus.

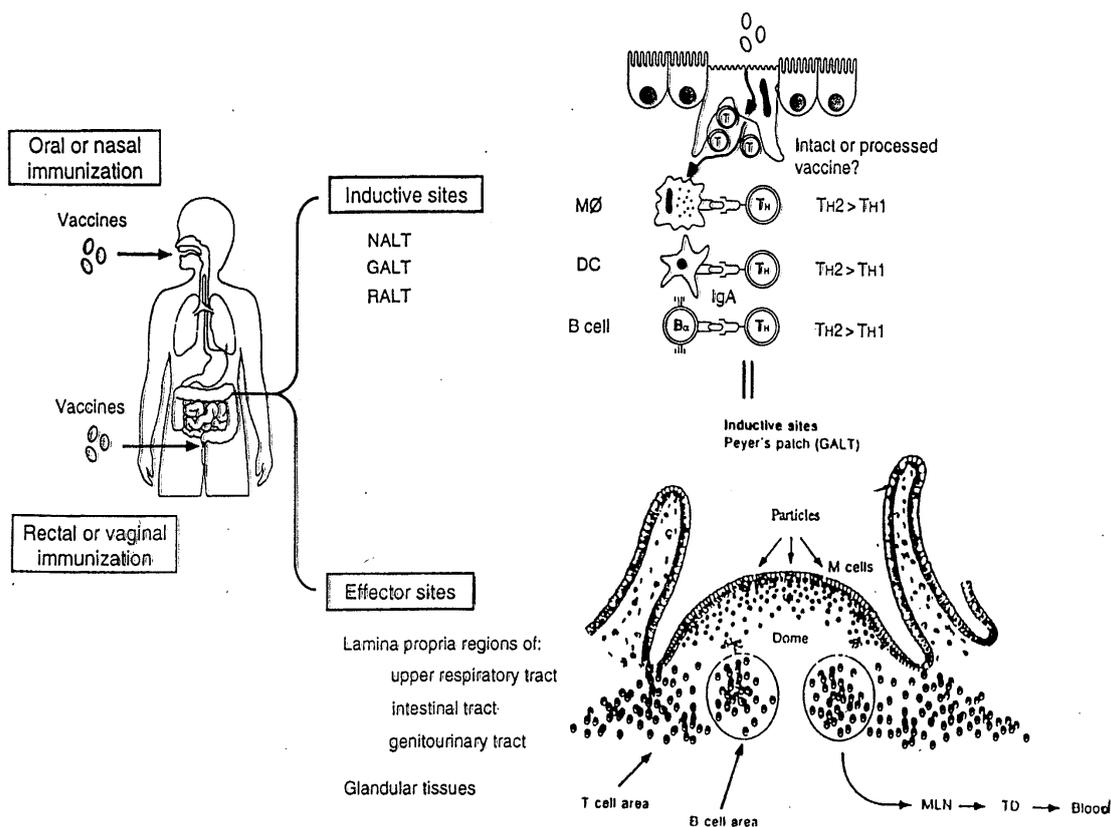


Abb. 3: CMIS (Common Mucosal Immune System)  
 abgeändert nach McGhee et al. (1994); Lavelle et al. (1995).

NALT - nasal associated lymphoreticular tissue, GALT - gut associated lymphoreticular tissue, RALT - rectal associated lymphoreticular tissue, DC - Dendritic Cells, TH - T-Helferzellen

Nach Aufnahme in APCs verbleiben Salmonellen endosomal. Selbst nach Ansäuerung der Phagosomen sind sie in der Lage zu überleben und sich zu vermehren. Die Anzahl überlebender Salmonellen ist dabei das Ergebnis eines Gleichgewichtes zwischen Abtötung durch die APC und Replikation (Buchmeier und Libby (1997). Abgestorbene Bakterien werden prozessiert, die Peptide in Vesikeln des Golgi-Apparates mit MHC Klasse II-Molekülen verbunden und die entstandenen Komplexe auf der Zelloberfläche präsentiert, wo sie vom T-Zellrezeptor der T-Helferzellen erkannt und gebunden werden (Wolf und Ploegh, 1995; Germain, 1994). Die Differenzierung der T-Helferzellen in Th1 oder Th2 und damit letztendlich der dominierende Typ der sich entwickelnden Immunität hängt dabei auch vom lokal vorherrschenden Zytokin-Milieu sowie der Art der beteiligten APC ab (Fitch et al., 1993; Schmitz und Radbruch, 1992; Comoy et al., 1997; Mastroeni et al., 1993; Golding und Scott, 1994). *In vitro* und *in vivo*-Messungen des Zytokin-Milieus wie auch die Bestimmung

der IgG-Subklassen nach Applikation von Salmonellen führten zu dem Schluß, daß durch lebende Salmonellen eine starke Th1-Immunantwort sowohl gegen den Träger als auch gegen das klonierte Fremdantigen induziert wird (Chong et al., 1996; George, 1996; Klimpel et al., 1995; Naiki et al., 1999; Ramarathinam, 1991; Thatte et al., 1993; VanCott et al., 1996; Karem et al., 1996). Während die Präsentation von in APCs endosomal prozessierten Antigenen über Moleküle der MHC Klasse II und die damit verbundene Stimulation von Th-Zellen längere Zeit bekannt war, konnte später gezeigt werden, daß *Salmonella*-Antigene auch als Komplexe mit Molekülen der MHC Klasse I auf APCs präsentiert werden (Aggarwal et al., 1990; Pfeifer et al., 1993; Malaviya et al., 1996; Svensson et al., 1997). Die ursprüngliche Ansicht, daß nur zytoplasmatisch prozessierte Antigene in den endogenen Antigen-Präsentationsweg gelangen können (Heemels und Ploegh, 1995) wurde damit widerlegt. Salmonellen induzieren demnach sowohl den MHC Klasse I vermittelten als auch den MHC Klasse II vermittelten Weg der Antigenpräsentation in APCs (Pfeifer et al., 1993; Verma et al., 1995; Yrlid et al., 2000) und können dabei sowohl den zellulären wie auch den humoralen Arm des Immunsystems aktivieren. Als Träger von Fremdantigenen fungieren sie als Vektor, Antigen und Adjuvans in einem.

Forschungsarbeiten, die die Verbesserung der Expression von Fremdantigenen in Salmonellen als Lebendvaccine zum Ziel hatten, haben kürzlich zur Entwicklung des Hämolysin-Export-Expressionssystems für rekombinante Salmonellen geführt (Gentshev et al., 1996; Hahn et al., 1998; Hess und Kauffmann, 1999; Hess et al., 2000a; Hess et al., 2000b). Dieses System erlaubt die erhöhte Expression von Fremdproteinen in Salmonellen und den Export des Proteins in den das Bakterium umgebenden Raum (Su et al., 1992; Li et al., 2000). Da Salmonellen intrazellulär im Endosom verbleiben, sollte es dort bei konstanter Expression des Antigens zu dessen Anreicherung und Einschleusung in den MHC Klasse II vermittelten Antigenpräsentationsweg und damit zur Stimulation von spezifischen T-Helferzellen kommen. Um zu prüfen, ob auf diesem Weg eine effektive Induktion PA-spezifischer Ak zu erreichen ist, wurde in eigenen Versuchen das PA-Gen als translationale Fusion mit der Hämolysin- (Hly) Exportkassette von *E. coli* im Serovar Typhimurium kloniert. Dafür konnte eine resynthetisierte Sequenz mit einer für die Translation in *E. coli* optimierten Codon-Nutzung (GenBank accession number AX353700, E.D. Williamson, J. Miller, and R.W. Titball, 8. Juli 2001, British Patent Office) unter einem starken Phagen-Promotor (T5) verwendet werden. Zur Stabilisierung der Export-Kassette wurde diese außerdem in das Chromosom der Salmonellen integriert. Die orale Immunisierung verschiedener Mäuse-Inzuchtlinien führte zu sehr heterogenen Ak-Anworten gegen PA, die vor allem durch die

Dominanz von Ak der Subklasse IgG2a und PA-spezifischen IFN $\gamma$ -Antworten geprägt waren (Beyer et al., 2001; Beyer et al., 2003). Nach intravenöser (i. v.) Applikation eines Salmonellen-Stammes mit chromosomaler Integration der das PA83-hlyA-Fusionsgen enthaltenden Expressionskassette an A/J-Mäuse änderte sich die Qualität der Immunantwort hin zu einer Mischung aus IgG1 und IgG2a Antikörpern. Diese Mäuse waren im Gegensatz zu oral immunisierten Tieren vollständig gegen eine intraperitoneale (i. p.) Belastung mit der 1000fachen LD<sub>50</sub> von Sporen des Vakzinestammes STI geschützt (Garmory et al., 2003). Weiterführende Versuche müssen nun zeigen, daß die Protektion auch über den oralen Applikationsweg und in anderen Tiermodellen zu erreichen ist.

Weitere Versuche zur Testung von Lebendvakzinen wurden mit *B. subtilis*-Phagen (Baillie et al., 1998, Thwaite et al., 1998), *F. tularensis* (Pavlov et al. 1998) sowie Baculo- und Vaccinia-Viren (Iacono-Connors et al., 1991) durchgeführt. Sie alle zeigten jedoch nur schwache Schutzraten in den verwendeten Tiermodellen. Lee et al. (2003) berichteten über die Immunsierung von A/J-Mäusen mit replikationsdefizienten PA83-kodierenden Partikeln des venezuelanischen Enzephalitis-Virus der Equiden (VEEV). Sie erhielten Schutzraten von 30-70 % nach einer relativ geringen Belastungsinfektion mit der 12-30fachen LD<sub>50</sub> Sterne-Sporen.

#### Die Kapsel und weitere bakterielle Antigene

Die Erzeugung einer adequaten humoralen Immunantwort gegen die Toxin-Komponenten, insbesondere gegen PA, ist für den Schutz gegen eine Infektion mit *B. anthracis* notwendig (Ivins und Welkos, 1988; Pitt et al, 1996a, b; Turnbull et al., 1986; 1988; 1990; Beedham et al., 2001). Auf der Suche nach immunologischen Korrelaten für die Protektion zeigten neuere Arbeiten in Meerschweinchen und Kaninchen die Bedeutung neutralisierender Antikörper gegen PA (Little et al., 1997, 2004; McBride et al., 1998; Reuveny et al., 2001; Pitt et al., 2001). Möglicherweise haben anti-PA Ak auch eine hemmende Wirkung auf die Germination von Sporen sowie eine opsonierende Funktion (Welkos et al., 2001, 2002). Jedoch ist seit langem bekannt, daß die im ELISA meßbaren humoralen Immunreaktionen nicht zwangsläufig mit einer Protektion gegen die Infektion einhergehen (Review: Ivins und Welkos, 1988). Darüber hinaus können sie keinen Schutz gegen die Infektion selbst bzw. gegen die Vermehrung der eingedrungenen Erreger bieten. Abgesehen von möglichen, bisher *in vivo* nicht bestätigten, hemmenden Einflüssen auf die Keimung der Sporen, können sie nur die Wirkung der beiden Toxine verhindern. Für die natürlich erworbene Immunität nach überstandener Infektion wird jedoch davon ausgegangen, daß sich die Abwehr sowohl gegen

die Sporen und deren Germination als auch gegen die sich vermehrenden vegetativen Erreger richtet und schon deshalb wesentlich effektiver ist als die herkömmliche Impfung mit ausschließlich Toxin-Antigenen. Außerdem wurde beobachtet, daß selbst ein toxinfreier, unbekapselter *B. anthracis* Stamm ein gewisses Maß an Protektivität induzieren kann (Cohen et al., 2000), somit also auch weitere Antigene zur Erhöhung der Protektivität einer Protein-Vakzine beitragen könnten. Diese Annahme wird stark gestützt durch die Ergebnisse von Brossier et al. (2002) zur Protektivität einer rPA-Alhydrogel-Vakzine in Kombination mit Formaldehyd inaktivierten Sporen von *B. anthracis* (FIS). Diese Kombination konnte 100 % der Versuchstiere (Mäuse und Meerschweinchen) gegen eine Infektion mit der 30fachen bzw. der 300fachen LD<sub>50</sub> vollvirulenter Sporen schützen, während mit rPA und Alhydrogel nur 0% und 22 % der Tiere überlebten.

Auf der Suche nach weiteren Strukturantigenen der vegetativen Zellen hatten Ezzell und Abshire (1988) Proteine des S-layers von *B. anthracis*, insbesondere das EA1, untersucht. Dieses Zellwandantigen zeigte jedoch keine protektive Wirkung.

Die Kapsel von *B. anthracis*, der zweite für eine vollständige Virulenz notwendige Faktor, besteht aus Poly- $\gamma$ -D-Glutaminsäure ( $\gamma$ DPGA, Green et al., 1985). Sie schützt aufgrund ihrer fehlenden Immunogenität die vegetative Zelle vor der Phagozytose nach Opsonierung und vor einer Zerstörung durch Komplementaktivierung (Makino et al., 1989; Ezzell et al. 1990; Ezzell und Welkos, 1999). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß sie den Angriff agglutinierender monoklonaler Ak auf die darunter liegende Zellwand verhindert (Sirisanthana et al., 1988). Als prominente Oberflächenstruktur wäre sie jedoch ein ideales Ziel für eine antibakterielle Vakzine. Neuere Arbeiten zeigen nun die Möglichkeit, durch Konjugation von  $\gamma$ DPGA unterschiedlicher Länge mit rPA, BSA oder Peptiden, spezifische Ak gegen die Kapsel zu induzieren. Dabei war rPA das effektivste Trägerprotein (Schneerson et al., 2003). Die in Mäusen induzierten Ak reagierten mit der Kapsel der als Modell verwendeten *B. licheniformis* und induzierten die Komplement vermittelte Lyse der Bakterien *in vitro*. Das von den Autoren verwendete Letaltoxin-Belastungsmodell in Mäusen gibt allerdings keine Auskunft über die Protektivität der Ak im infizierten Tier. Die mit einer reinen rPA-Vakzine immunisierten Tiere überlebten ebenso wie die mit der rPA- $\gamma$ DPGA-Konjugatvakzine immunisierten (Rhie et al., 2003).

Die Suche nach weiteren Antigenen für die Verwendung in Vakzinen konnte in den letzten Jahren dank der elektronischen Verfügbarkeit der vollständigen DNA-Sequenz eines Stammes von *B. anthracis* intensiviert werden (Institute for Genomic Research, www.tigr.org). Aus diesen Arbeiten resultierte die Beschreibung von Proteinen aus dem

Exosporium als Antigene (Sylvestre et al., 2002; 2003; Ariel et al., 2002; Steichen et al., 2003). Ihre Bedeutung, wie auch die des Exosporiums überhaupt, bei der natürlichen Infektion sowie in der Abwehr der Erreger ist bislang nicht im Detail untersucht. In eigenen Versuchen zum Einsatz einer DNA-Vakzine auf der Basis eines Exosporium-Antigens (BclA) erwies sich die Protektivität einer Kombinations-Impfung aus rPA-kodierenden und BclA-kodierenden Plasmiden mittels Gene Gun, nach einer Belastung von Mäusen mit der 25fachen LD<sub>50</sub> von Sporen des Ames-Stammes, als signifikant besser als nach Impfung mit jeweils nur einem Konstrukt (Hahn et al., 2005a, eingereicht). Weitere Untersuchungen zur Natur der durch das BclA-Antigen induzierten Immunantwort müssen nun zeigen, ob sich dieses Antigen als Komplement für PA zur Induktion auch einer gegen den Erreger selbst gerichteten Immunantwort eignet.

#### Versuche zur Wirkung verschiedener Adjuvantien

Die bessere Protektivität von Sporen-Lebendvakzinen im Vergleich zu den lizenzierten Protein-Vakzinen, bei gleichzeitig häufig geringeren Ak ELISA-Titern, wurde insbesondere auf eine bessere Stimulation der zellulären bzw. zellvermittelten Immunantwort zurückgeführt (Klein et al., 1962; Ivins et al., 1986; Littel und Knudson, 1986; Turnbull et al., 1986; Ivins und Welkos, 1988; Broster und Hibbs, 1990). Dabei sollte beachtet werden, daß es sich bei diesen Vergleichen immer um die gleichen Adjuvantien in den Protein-Vakzinen handelte (Aluminiumhydroxid oder Alum) und die meisten der älteren Versuche mit Meerschweinchen durchgeführt worden waren. Bekanntermaßen sind letztere im Gegensatz zu Kaninchen oder Rhesusaffen nur unvollständig durch die Immunisierung mit AVA oder AV-UK gegen eine Infektion zu schützen (Ivins et al., 1992, 1994, 1995; Fellows et al., 2001). Abhängig von den Schutzraten spricht man im Meerschweinchenmodell von „vakzineresistenten“ Stämmen von *B. anthracis*. Ivins et al. (1990, 1992, 1995) konnten zeigen, daß die angeborene Immunität stimulierende Adjuvantien wesentlich die protektive Wirkung einer PA-Immunisierung verbessern und damit auch Meerschweinchen und selbst Mäuse gegen vollvirulente *B. anthracis* Stämme zu schützen sind. Die Wirkung dieser Adjuvantien war damals nicht erklärbar. Heute ist bekannt, daß sich auch hinter den sogenannten angeborenen Immunitätsmechanismen mit einer gewissen Spezifität ausgestattete Rezeptoren (Toll like Rezeptoren) verbergen. Diese sind nach Aktivierung durch bestimmte Molekülgruppen in der Lage, die Aktivierung von CD4 positiven T-Zellen durch APCs und im Gefolge eine erworbene, spezifische Immunität zu verstärken.

Unter den folgenden getesteten Adjuvans-Kombinationen, Lipidamine (Ivins et al. 1992); Saponin QS-21 (Ivins et al., 1995, 1998); MF-59 Emulsion (Ivins et al., 1995); SAF-M Emulsion+Copolymer L121 (Ivins et al., 1995); Muramyl-Tripeptid (Ivins et al., 1995, 1998); Threonyl-Muramyl-Dipeptid (Ivins et al., 1992, 1995); Monophosphoryl-Lipid A (MPL), (Ivins et al., 1992, 1995, 1998); MPL+Trehalose-Dimycolat (TDM)+mykobakterielle Zellwandbestandteile (CWS), (Ivins et al., 1992; Turnbull, 1991; McBride et al., 1998); MPL+CWS (Ivins et al., 1992); hitzeinaktiviertes *Corynebacterium ovis* (Turnbull et al., 1988); abgetötete *Bordetella pertussis* (Turnbull et al., 1990); komplettes Freund's Adjuvans (CFA), (Turnbull et al., 1988); Quil-A Saponin (Turnbull et al., 1988); Gasil-23D, ein synthetisches Silicon-Dioxid (Turnbull et al., 1988); Liposomen, CpG-Oligonukleotide,  $\beta$ -Glucanpartikel (Adjuvax), Matrix M-40 Iscoms, Polyphosphazene (Ivins, nicht veröffentl. Ergebnisse) waren insbesondere die Verbindung von CFA und abgetöteten Bakterien sowie die als RIBI-Trimix erhältliche Kombination aus MPL+CWS+TDM hoch wirksam (Turnbull, 1991). Die Mischung aus RIBI und PA schützte schon als einzelne Dosis 95 % der Meerschweinchen gegen eine i. m. Infektion mit der 2000fachen LD<sub>50</sub> Sporen des Ames-Stammes, während mit Alhydrogel und PA nur 50 % der Tiere überlebten (Ivins et al., 1992). Noch drastischer fielen die Ergebnisse nach einem Aerosol-Challenge mit Dosen bis  $4 \times 10^6$  Sporen des Ames-Stammes aus, wonach nur 7-14 % der AVA vakzinierten Tiere, aber 100 % der RIBI/rPA vakzinierten Tiere überlebten (Miller et al., 1998; McBride et al., 1998). Auch in eigenen Versuchen wurde dieses Adjuvans zur Etablierung von Positivkontrollgruppen erfolgreich eingesetzt. Allerdings verbietet sich aufgrund der bekannten erheblichen Nebenwirkungen beim Tier ein Einsatz beim Menschen, weshalb in eigenen Arbeiten an der Testung eines in anderem Zusammenhang bereits mehrfach erprobten Lipopeptid-Adjuvans (Loleit et al., 1996; Schild et al., 1991; Schlecht et al., 1989; Wiesmüller et al., 1989) für den Einsatz in einer Anthrax Protein-Vakzine gearbeitet wurde. In präklinischen Versuchen mit rPA und dem Lipopeptid-Adjuvans waren 80 % der Mäuse nach Dreifachimmunisierung und alle Kaninchen bereits nach 2 Immunisierungen gegen eine Infektion mit 800 ( $21 \times \text{LD}_{50}$ ) bzw.  $2 \times 10^6$  ( $2000 \times \text{LD}_{50}$ ) Sporen vom Ames-Stamm geschützt. Mäuse, die mit der gleichen Dosis rPA, jedoch mit Al(OH)<sub>3</sub> als Adjuvans immunisiert worden waren, waren nur zu 20 % geschützt. Keines der Tiere zeigte klinisch sichtbare Nebenwirkungen des Adjuvans (Hahn et al., 2005a).

### Rekombinante Plasmide zur DNA-Vakzinierung

Die Induktion sowohl humoraler wie auch zellvermittelter Immunantworten durch Applikation der genetischen Information antigener Determinanten in eukaryontischen Expressionskassetten (Nukleinsäure-Immunisierung) ist ein sich zur Zeit sehr schnell entwickelndes Gebiet der Impfstoffforschung. Die Einsatzgebiete (virale, bakterielle, parasitäre Erreger, Tumorphylaxe und -bekämpfung) wie auch die verschiedenen Applikationsformen (gereinigte DNA per Injektion, per Gene Gun oder über die Schleimhäute; parenteral oder oral nach Mikroenkapsulierung; im bakteriellen Lebendvektor; als Einzel-Gen oder Plasmid-Genbank) sind äußerst vielfältig (Alarcon et al., 1999; Davis und McCluskie, 1999; Gregersen, 2001).

Gu et al. (1999) publizierten erstmals die i. m. Vakzinierung von Balb/c-Mäusen mit einem PA-kodierenden Expressionsvektor. Die DNA-Vakzine induzierte eine gemischte Th1/Th2-Immunantwort, und 7 von 8 immunisierten Tieren waren gegen eine Belastung mit dem Letaltoxin gefeit. Price et al. (2001) erweiterten diese Versuche mit einem LF-kodierenden Plasmid. Die DNA wurde mittels Gene Gun appliziert und die Tiere mit dem Letaltoxin intravenös (i. v.) belastet. 100 % der immunisierten Tiere überlebten den Challenge mit einer angegebenen Toxin-Dosis von 5 x LD<sub>50</sub>. Eigene Erfahrungen und die anderer Gruppen (Leppla, pers. Mtlg.) mit dem Toxin-Challengemodell geben jedoch Anlaß, an den publizierten Toxin-Dosen zu zweifeln, da sie nicht zu der erwarteten Todesrate in naiven Tieren führten.

In Versuchen zur Entwicklung einer multivalenten DNA-Vakzine, die gleichzeitig gegen *B. anthracis*, Ebola-Viren, Marburg-Viren und das venezuelanische Enzephalitisvirus der Equiden (VEEV) schützen soll, wurden im Vorversuch Kaninchen viermal mit einem PA kodierenden Plasmid per Gene Gun immunisiert und danach mit vollvirulenten Sporen infiziert. Dabei wurde zunächst jeweils die außergewöhnlich hohe Menge von 20 µg DNA in 8 Dosen pro Tier appliziert. Die 4. Immunisierung begründeten die Autoren mit dem Rückgang der Ak-Titer nach der 3. Immunisierung. Den s. c. Challenge mit der 100fachen LD<sub>50</sub> Sporen des Ames-Stammes überlebten 9 von 10 Tieren. Die Kombination aller 4 Antigene testeten die Autoren im Meerschweinchenmodell, allerdings ohne eine Belastungsinfektion mit *B. anthracis* durchzuführen, sodaß dafür keine Daten zu Schutzraten vorliegen. Gegen die anderen drei Erreger ergaben sich unterschiedlich hohe Schutzraten (Riemenschneider et al., 2003).

In eigenen Versuchen wurde die Effektivität von DNA-Vakzinen im Mausmodell geprüft (Hahn et al., 2004). Balb/c- und A/J-Mäuse wurden mit PA-kodierenden Plasmiden

immunisiert. Durch Nutzung unterschiedlicher Targeting-Signale auf den Plasmiden wurde das Antigen entweder sekretiert oder im endoplasmatische Retikulum (ER) der exprimierenden Zellen verankert. Zusätzlich wurde die Immunogenität des vollständigen Proteins, PA83, mit der des physiologisch aktiven Teils, PA63, verglichen. Erstes induzierte dabei in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Flick-Smith et al. (2002) signifikant höhere Ak-Titer, vorrangig IgG1, sowie IL-4 und IL-5 Zytokin-Konzentrationen. Nach dreifacher Immunisierung von A/J-Mäusen mit jeweils 1 µg oder 5 µg DNA wurden die Tiere mit der 100fachen LD<sub>50</sub> Sporen des Vakzinestammes STI belastet. Die Überlebensraten lagen bei bis zu 83 % für die sekretierte PA-Form und bis zu 100 % für die im ER verankerte PA-Form.

Möglichkeiten zur Verbesserung der Effektivität von DNA-Vakzinen bestehen insbesondere in der Optimierung der Antigenexpression *in vivo* sowie des Antigenpräsentationsweges und der an der Antigenpräsentation beteiligten Zellen. Letzteres wurde zum Beispiel durch die Kombination von Expressionskassetten mit unterschiedlichem Targeting des Proteins erreicht, bei der das Antigen sowohl B-Zellen in sekretierter Form als auch T-Helferzellen in Verbindung mit MHC Klasse II präsentiert wird (Hahn et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit bietet die translationale Verknüpfung des Antigens mit einem Signal aus der invarianten Kette, wodurch das Fusionsprotein gezielt in den MHC Klasse II-Präsentationsweg von APCs eingeschleust wird (Odorizzi et al., 1994; Wu et al., 1995; Sanderson et al., 1995; Malcherek et al., 1998; Sponaas et al., 1999; Kallinteris et al., 2003). In orientierenden Versuchen in Schafen wurden durch entsprechend konstruierte Expressionsvektoren höhere und länger anhaltenden Ak-Antworten induziert (Beyer et al., 2005b; Hahn et al., 2005, eingereicht).

Weitere Optimierungsmöglichkeiten ergeben sich aus der Verpackung von Expressionsvektoren mit Substanzen, die nicht nur die enthaltenen DNA vor dem Abbau durch Nukleasen schützen, sondern auch die Aufnahme der Komplexe in Zellen stimulieren (Doria-Rose und Haigwood, 2003; Hahn et al., 2005b, eingereicht). Eine besondere Möglichkeit der Immunstimulation besteht durch die gemeinsame Applikation der Expressionsvektoren mit zytokinkodierenden Plasmiden. Dabei läßt sich sowohl die Immunogenität des Antigens steigern als auch die Art der Immunantwort beeinflussen (Thalhammer et al., 2001).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Plasmide und Vektoren

Die zur Konstruktion und in den Immunisierungsversuchen verwendeten Vektoren sind in Tabelle 1 enthalten.

Tabelle 1: Verwendete Plasmide und Vektoren

Vektor	Beschreibung	Quelle
Tn5pUTKm	Transposonvektor	De Lorenzo et al. (1994)
pLG612	Klonierungsvektor mit HlyA-Signalsequenz	Tzschaschel et al. (1996)
pVDL9.3	Klonierungsvektor mit Hly-Exportsystem	Tzschaschel et al. (1996)
pSecTag2B	eukaryontischer Expressionsvektor mit Signal zur Proteinsekretion	Invitrogen, Kat.Nr. V900-20
pCMV/myc/ER	eukaryontischer Expressionsvektor mit Signal zur Proteinretention im ER	Invitrogen, Kat.Nr. V823-20
pcDNA4/myc-His	eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen, Kat.Nr. V863-20
pVAX1	eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen, Kat.Nr. V260-20
pQE30	prokaryontischer Expressionsvektor	Qiagen, Kat.Nr. 32915
pQE30PA83 B/S	Expressionsplasmid für PA83	diese Arbeit
pQE30PA83ec	Expressionsplasmid für PA83ec	diese Arbeit
pVDLPA63ec	Expressionsplasmid für PA63ec	diese Arbeit
pVDLPA83c	Expressionsplasmid für PA83ec	diese Arbeit
pUTKmPA63ec	Transposonvektor für PA63ec	diese Arbeit
pUTKmPA83ec	Transposonvektor für PA83ec	diese Arbeit
pVDLPA63ecIL-1ec	Expressionsplasmid für PA63ec und IL1-Peptid	diese Arbeit
pUTKmPA63IL-1ec	Transposonvektor für PA83ec und IL1-Peptid	diese Arbeit
pSeqTag PA83	Expressionsplasmid mit Exportsignal für PA83	diese Arbeit
pSecTag-4ß8	Expressionsplasmid mit Exportsignal für 4ß8-Peptid	diese Arbeit
pCMV/ER PA83	Expressionsplasmid mit ER-Retentionssignal für PA83	diese Arbeit
pCMV/ER PA63	Expressionsplasmid mit ER-Retentionssignal für PA63	diese Arbeit
pVAX PA83	Expressionsplasmid, rPA83 im Zytoplasma	diese Arbeit
pVAX PA63	Expressionsplasmid, rPA63 im Zytoplasma	diese Arbeit

Tabelle 1: Verwendete Vektoren (Fortsetzung)

Vektor	Beschreibung	Quelle
pVAX-4ß8	Expressionsplasmid, 4ß8-Peptid im Zytoplasma	diese Arbeit
pcDNA4 PA83Kozak	Expressionsplasmid, rPA83 im Zytoplasma	diese Arbeit
pcDNA4 PA63Kozak	Expressionsplasmid, rPA63 im Zytoplasma	diese Arbeit

### 3.2. Bakterienstämme

Die für die Klonierungen und in den Immunisierungsversuchen verwendeten Bakterien sind in Tabelle 2 enthalten.

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Bakterium	Stamm	Beschreibung / Quelle
<i>E. coli</i>	Top10 F' Top10F'pRep4 BL21pRep4	zur Klonierung (Invitrogen <sup>1</sup> ) Top10F' mit Plasmid pRep4 (Quiagen <sup>2</sup> ) zur Proteinpräparation BL21 (Stratagene <sup>3</sup> ) mit Plasmid pRep4 zur Proteinpräparation
	CC118 λpir	Δ(ara-leu), araD, ΔlacX74, galE, galK, phoA20, thi-1, rpsE, rpoB, argE (Am), recA1, λ pir, GBF Braunschweig
	S17.1 λpir	recA, thi, pro, hsdR-M+ RP4:2-Tc:Mu:KmTn7, λpir; GBF Braunschweig
Salmonellen	χ3730	Salmonelle Serotyp Typhimurium zur Zwischenklonierung, Curtiss-System, asd-, m+, r-; R. Curtiss, Universität Washington
	χ3730REP4	wie χ3730, mit lacI <sup>q</sup> -Repressor-Plasmid, R. Curtiss, Universität Washington
	Zoosaloral H® ZpVDL9.3 ZpVDLPA63ec ZpVDLPA83ec ZpVDLPA63ecIL-1ec ZpUTKmPA63ec ZpUTKmPA83ec ZpUTKmPA63ecIL-1ec ZpCMV/ERPA63 ZpCMV/ER PA83	Salmonellen-Impfstamm, Dessau-Tornau Kontrollstamm: Plasmid pVDL9.3 im Zoosaloral H Vakzinestamm: PA63ec plasmidal kodiert Vakzinestamm: PA83ec plasmidal kodiert Vakzinestamm: PA63ecIL-1 plasmidal kodiert Vakzinestamm: PA63ec chromosomal kodiert Vakzinestamm: PA83ec chromosomal kodiert Vakzinestamm: PA63ecIL-1ec chromosomal kodiert Vakzinestamm: PA63 auf eukaryont. Plasmidvektor Vakzinestamm: PA83 auf eukaryont. Plasmidvektor

<sup>1</sup> #3030

<sup>2</sup> #34210

<sup>3</sup> #200133

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme (Fortsetzung)

Bakterium	Stamm	Beschreibung / Quelle
	ZpsecTag PA83	Vakzinestamm: PA83 auf eukaryont. Plasmidvektor
	ZPVAX 4ß8	Vakzinestamm: 4ß8-Peptid auf eukaryont. Plasm.vektor
	ZpVAX PA83	Vakzinestamm: PA83 auf eukaryont. Plasmidvektor
	ZpVAXPA63	Vakzinestamm: PA63 auf eukaryont. Plasmidvektor

### 3.3 Oligonukleotide

Die PCR wurde zur Herstellung klonierbarer Sequenzabschnitte sowie zur Bestätigung von Klonierungen eingesetzt.

Die bei der Klonierung der im weiteren beschriebenen rekombinanten Vektoren verwendeten PCR-Primer enthält Tabelle 3.

Tabelle 3: Primer zur Klonierung

Name	Sequenz	Länge in bp
PA83Nhe	5'-ATA GCT AGC ATG GAA GTT AAA CAG GAG AAC CG-3'	32
PA63Nhe	5'-ATA GCT AGC ATG GCT GGA CCT ACG GTT CC-3'	29
PArevApa	5'-GCA GGG CCC TTA TCC TAT CTC ATA GCC-3'	27
pQEPAXhoneu	5'-CCC TTT CGT CTT CAC CTC GAG AAA TC-3'	23
ecPA63Bam	5'-ATA GGA TCC ACC AGC GCT GGC CCG-3'	24
ecPAendSma	5'-ATA CCC GGG ACC GAT CTC GTA ACC-3'	24
ecPA83Bam	5'-ATA GGA TCC GAA GTA AAG CAA GAG AAC-3'	27
ecPAStopSal	5'-ATA GTC GAC TTA ACC GAT CTC GTA AC-3'	26
PArevSal	5'-ATA GTC GAC ATC CTA CAA ACA ATC TCA AAG G-3'	31
PA63Paul	5'-AGC GCG CAC TCC ACA AGT GCT GGA CCT ACG G-3'	31
PAendNot2	5'-GCG GCG GCC GCT CCT ATC TCA TAG CC-3'	26
PAPaul	5'-GGC GCG CC TCC GAA GTT AAA CAG GAG AAC-3'	30
PAendNot	5'-TAT GCG GCC GCT CCT ATC TCA TAG CC-3'	26
PArevApaI	5'-ATA GGG CCC TCC TAT CTC ATA GCC-3'	24
PAKpnl	5'-ATA GGT ACC GAA GTT AAA CAG GAG AAC CG-3'	30
PAKozak	5'-ATA GGT ACC ATG GAA GTT AAA CAG GAG AAC CG-3'	32
PABam	5'-ATA GGA TCC GAA GTT AAA CAG GAG AAC CG-3'	29
PA63Bam	5'-ATA GGA TTC AGT ACA AGT GCT GGA CCT ACG-3'	30
PAendSal	5'-ATA GTC GAC TCC TAT CTC ATA GCC-3'	24
pQEPAXho	5'-TTT CGT CTT CAC CTC GAG AAA TC-3'	23

Die PCR wurde in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß in einem Volumen von 100 µl durchgeführt.

Ein PCR-Ansatz enthielt die folgenden Bestandteile: 1-2 µl DNA [ $<1\mu\text{g}$ ], 5µl je Primer [20 µM], 16 µl dNTP [1,25 mM], 1 µl High Fidelity Polymerase (Boehringer, Mannheim) [3,5 U/µl], 10 µl Reaktionspuffer [10fach konzentriert]. Nach einem einmaligen

Denaturierungsschritt bei 94 °C, 4 min folgten 25-30 Zyklen in nachstehender Reihenfolge: Denaturierung bei 94 °C, 1 min, Annealing für 1,5 min (die Temperatur war von den Primern abhängig und lag in der Regel zwischen 45 °C und 60 °C), Elongation bei 73 °C, 1,5 min + 10 sec. Verlängerung pro Zyklus. Zum Abschluß folgte ein Syntheseschritt bei 72 °C für 5 min.

### **3.4 Gentechnische Standardmethoden**

Sofern nicht anders beschrieben, wurden für bei molekularen Klonierungen üblichen Methoden wie Restriktionsspaltungen von DNA, Ligation, Transformation und Agarosegel-Elektrophoresen die Standardtechniken verwendet (Sambrook et al., 1989).

Für die Reinigung von PCR-Produkten wurde der Qiaquick Spin PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden<sup>4</sup>), zur DNA-Isolation aus Agarosegelen der Jetsorb Gel Extraction Kit (Genomed, Bad Oeynhausen<sup>5</sup>) nach Herstellerangaben verwendet.

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden Präparationskits der Firma Roche (High Pure Plasmid Isolation Kit<sup>6,7</sup>) verwendet. Für den Einsatz als Vakzine-DNA wurden die entsprechenden endotoxinfreien Präparationskits von Qiagen (EndoFree Megakit<sup>8</sup>) oder von Machery Nagel (Nucleobond PC 2000-EF bzw. 10000-EF<sup>9</sup>) benutzt.

### **3.5. Detektion von Proteinbanden aus rekombinanten Bakterien im Immunoblot**

#### **3.5.1. Vorbereitung der Bakterien**

Aus einer Übernachtskultur wurden 100 µl Bakteriensuspension in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert (14000 x g, 1 min). Das Pellet wurde in 100 µl 1 x F-Puffer\* mit 1/10 Volumen Glycerin resuspendiert und anschließend für 10 min bei 100 °C gekocht. Die fertigen Proben wurden bis zum Auftragen auf Eis gehalten, konnten jedoch auch bei -20°C gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut werden. Je 20 µl der Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel zur elektrophoretischen Trennung aufgetragen.

---

<sup>4</sup> #28160

<sup>5</sup> #110150

<sup>6</sup> #1754785

<sup>7</sup> #12123

<sup>8</sup> #12381

<sup>9</sup> 740549

\*F-Buffer: 20 ml 0,08 M Tris-HCl, pH 6,8 enthalten:  
 0,3 g DTT<sup>10</sup>  
 4,0 ml 10 % SDS<sup>11</sup>  
 1,6 ml 1M TrisHCl, pH 6,8  
 2,5 ml Glycerin<sup>12</sup>  
 0,5 mg Bromphenolblau<sup>13</sup>

### 3.5.2. Protein-Blotting und Detektion

Für die Protein-Gelelektrophorese wurden Gele mit 7,5 % und 10 % Polyacrylamid verwendet. Die Herstellung des Gels und Durchführung der Elektrophorese sowie das anschließende Übertragung der Banden auf Nylonfilter erfolgte nach den üblichen Standardvorschriften (Sambrook et al., 1989).

Die für die Detektion verwendeten Antikörper enthält Tabelle 4.

Tabelle 4: Für die Detektion verwendete Antikörper

Antikörper	Quelle
Anti-myc Antikörper	Invitrogen, NL <sup>14</sup>
Anti-His (C Term)-HRP	Invitrogen, NL <sup>15</sup>
Anti-mouse IgG (Fab specific)	Sigma, Steinheim <sup>16</sup>
Anti-PA mAb	Biodesign Int., Saco, ME <sup>17</sup>

Nach der Übertragung (Blotting) der Proteinbanden wurde die Transfermembran auf einem Schüttler bei Raumtemperatur wie folgt behandelt:

- 2 x 10 min in TBS\*
- 1 h im Blocking-Puffer\*\*
- 3 x 10 min in TBS-Tween 20\*\*\*
- 1 h mit dem 1. Ak (z. B. antiPA-mAb: 1:2000 in 0.5 % Blocking Reagenz<sup>18</sup>)

<sup>10</sup> Merck, Darmstadt #111474

<sup>11</sup> Roth, Karlsruhe #2326.2

<sup>12</sup> Roth, Karlsruhe #3783.1

<sup>13</sup> Roth, Karlsruhe #A512.1

<sup>14</sup> #46-0603

<sup>15</sup> #46-0707

<sup>16</sup> #A-2304

<sup>17</sup> #C86613M

<sup>18</sup> Boehringer, Mannheim #1093657

- 3 x 10 min in TBS-Tween 20<sup>19</sup>
- 1 h mit dem 2. Ak (entfällt, wenn ein HRP-Konjugat als erster Ak verwendet wurde)
- 2 x 10 min in TBS-Tween 20
- 1x Spülen in deionisiertem Wasser
- 5 ml POD-Substrat (BM blue<sup>20</sup>) ca. 5 min
- Dokumentation mittels Videokamera

#### Verwendete Puffersysteme:

*TBS:	4 M NaCl, 1 M Tris, pH 7.4
**Blocking-Puffer:	3 ml Blocking Stock, 17 ml TBS
***TBS-Tween:	TBS mit 500 µl Tween 20 auf 1l Puffer
Blocking Stock (10 %):	10 % Blocking Reagenz (Roche), 90 % Maleinsäurepuffer
Maleinsäurepuffer:	23.21 g Maleinsäure <sup>21</sup> 17.53 g NaCl <sup>22</sup> 16.06 g NaOH <sup>23</sup> pH 7.5

### **3.6 Präparation von rekombinantem PA aus *E. coli* mittels FPLC**

Die Anzucht der das rekombinante Plasmid tragenden Bakterien erfolgte nach den Angaben im Handbuch der Firma Quiagen (Qiaexpressionist<sup>TM</sup>, Quiagen 1998). Für die Proteinpräparationen wurden die *E. coli* K12-Stämme TOP10F' (Invitrogen<sup>24</sup>) oder BL21 (Stratagen<sup>25</sup>), in die zuvor das ein lacI<sup>q</sup>-Repressorgen tragendes Plasmid, pRep4 (aus *E. coli* SG1309 rRep4, Quiagen<sup>26</sup>), inkloniert worden war, verwendet.

#### Vorgehensweise zur Anzucht und Lyse der Bakterien:

Zweimal je 50 ml Übernachtskultur von TOP10F'pRep4 mit dem Vektorplasmid pQE30PA83ec wurden auf je 450 ml Standard I-Bouillon<sup>27</sup> mit 50 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Ampicillin überführt und bei 37 °C auf einem Schüttler bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 angezogen. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von Isopropyl β-D-1-

<sup>19</sup> Merck, Darmstadt, Deutschland #817072

<sup>20</sup> Boehringer Mannheim #1442066

<sup>21</sup> Roth, Karlsruhe #3538

<sup>22</sup> Merck, Darmstadt #106400

<sup>23</sup> Merck, Darmstadt #106495

<sup>24</sup> #C3030

<sup>25</sup> #200133

<sup>26</sup> #34210

<sup>27</sup> Merck, Darmstadt #1.07882

thioglucopyranosid<sup>28</sup> (IPTG), Endkonzentration 1 mM, induziert und die Kultur für weitere 3 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4 °C, 4000 x g, 10 min, pelletiert, das Pellet in 100 ml Lysepuffer A\* mit Proteaseninhibitoren\*\* aufgenommen und im Eiswasserbad auf dem Magnetprüher 1 h gerührt. Das Lysat wurde bei 4 °C abzentrifugiert, 12.000 x g, 20 min und der Überstand bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gehalten.

#### Vorgehensweise zur Isolation und Reinigung des rPA83ec mittels FPLC (Gerät Äktaprime, Amersham Pharmacia):

Die Trennsäule (5 ml HiTrap Chelating Column (Amersham), mit NiSO<sub>4</sub> beschichtet) wurde bei einer Fließrate von 3 ml/min mit 50 ml Lysepuffer A\* equilibriert. Danach wurde das gefilterte Lysat aufgetragen und die Säule erst mit 50 ml Puffer B<sup>†</sup> (pH 8.0) danach mit 50 ml Puffer C<sup>††</sup> (pH 6.3) gewaschen. Die Elution des rPA83ec erfolgte mit 45 ml Elutionspuffer E<sup>†††</sup>, das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt und proteinhaltige Fraktionen gepoolt.

Das gepoolte Eluat wurde im Dialyseschlauch stufenweise gegen einen HEPES-Puffer (5 mM HEPES (Sigma, #4034), 50 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) mit sinkenden Harnstoffkonzentrationen dialysiert: 1x 3 h in HEPES mit 1 M Harnstoff, 1x 1,5 h in HEPES mit 0.5 M Harnstoff, 1x 1 h in HEPES mit 0.1 M Harnstoff und 3x je 30 min in HEPES ohne Harnstoff.

Die Proteinkonzentration des rPA83ec im PBS wurde mit dem Coomassie Plus Protein Reagent (Pierce, Rockford, IL) mit Hilfe von bekannten Bovinen Serumalbumin<sup>29</sup> (BSA) Konzentrationen als Standards bestimmt.

#### Verwendete Chemikalien und Puffersysteme:

\*\*Proteaseninhibitor-Cocktail: (1:100 verdünnt eingesetzt)

Pepstatin A <sup>30</sup>	0,5 mg/ml in DMSO
Bestatin <sup>31</sup>	0,5 mg/ml in DMSO
E64 <sup>32</sup>	0.25 mg/ml in DMSO
Phosphoramidon <sup>33</sup>	0.25 mg/ml in DMSO
PMSF <sup>34</sup>	1 mM Endkonzentration

<sup>28</sup> Sigma # I 6758

<sup>29</sup> Serva #11930

<sup>30</sup> Uptima, Deutschland #827752

<sup>31</sup> Uptima, Deutschland #300991

<sup>32</sup> Uptima, Deutschland #789581

<sup>33</sup> Uptima, Deutschland #348115

Puffer für FPLC (sterilfiltriert und entgast):

\*Lysepuffer A, pH 8.0:

6 M Guanidine-HCl<sup>35</sup>  
0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>37</sup>  
0,01 M TrisHCl<sup>38</sup> pH 8  
10 mM Imidazol

<sup>†</sup>Puffer B, pH 8.0:

8 M Harnstoff<sup>36</sup>  
0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,01 TrisHCl, pH 8  
10 mM Imidazol

<sup>††</sup>Puffer C, pH 6.3:

8 M Harnstoff<sup>39</sup>  
0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0.01 M TrisHCl, pH 6.3  
10 mM Imidazol<sup>40</sup>

<sup>†††</sup>Elutionspuffer E, pH 4.5:

8 M Harnstoff  
0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,01 TrisHCl, pH 4.5

### 3.7 ELISA für die Bestimmung von Serumantikörpern

#### Lösungen:

Beschichtungspuffer: 0,1 M Natriumcarbonatlösung (8,4 g/l NaHCO<sub>3</sub><sup>41</sup>, 3,56 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>42</sup>, pH 9,5, ca. 1 Woche bei 4 °C haltbar)

Tween-PBS: PBS mit 0.05 % Tween-20

Blocking-Lösung: PBS mit 10 % FKS<sup>43</sup>

ABTS Substratlösung<sup>44</sup>: 1 Tablette 5/50 mg in 5/50 ml ABTS Puffer (lichtgeschützt stabil bis 3 Monate, bei 4 °C).

#### Vorgehensweise:

- Nunc MaxiSorp 96-Well Platten beschichten mit 1 µg Protein in 100 µl Beschichtungspuffer pro Vertiefung.
- Platte über Nacht bei 4 °C inkubieren.
- Lösung absaugen und Platte 10 x mit Tween-PBS waschen.
- Vertiefungen mit 200 µl PBS + 10 % FKS für 1h bei RT blocken.

---

<sup>34</sup> Roth, Karlsruhe #6367.1

<sup>35</sup> Roth, Karlsruhe #0037.1

<sup>36</sup> Serva, Deutschland #

<sup>37</sup> Merck, Darmstadt #106345

<sup>38</sup> Roth, Karlsruhe #4855.2

<sup>39</sup> Roth, Karlsruhe #3899.2

<sup>40</sup> Merck, Darmstadt #104716

<sup>41</sup> Merck, Darmstadt #106329

<sup>42</sup> Merck, Darmstadt #106393

<sup>43</sup> Biochrom, Berlin #50115

<sup>44</sup> Roche, Mannheim #1112422

- Lösung absaugen und 100 µl Proben auftragen (Serum in geeigneter Anfangsverdünnung in PBS + 10 % FKS, danach in log<sub>2</sub> Verdünnungstufen austitriert).
- 1 h bei RT inkubieren.
- 10 x mit Tween-PBS waschen.
- Polyklonales Ziege-anti-Maus-Ig HRP-Konjugat<sup>45</sup>, 1:1000 verdünnt, bzw. Ziege-anti-Kaninchen HRP-Konjugat<sup>46</sup>, 1:1000 verdünnt in PBS + 10 % FKS, 100 µl pro Vertiefung zugeben.
- 20 min bei RT inkubieren.
- 10 x mit Tween-PBS waschen.
- Substratlösung auftragen, 100 µl pro Vertiefung und 30 min im Dunkeln bei RT inkubieren.
- Platte im ELISA-Reader bei 414 nm messen.

Die Bestimmung von IgA<sup>47</sup>, IgM<sup>48</sup>, gesamt IgG<sup>49</sup> und IgG<sup>50</sup>-Subklassen folgte dem gleichen Schema. Das sekundäre Ak-Konjugat wurde entsprechend angepaßt.

Das Gesamtprotein aus Salmonellen wurde aus dem Stamm Zoosaloral H gewonnen. Dazu wurden 50 ml Bakterienkultur nach Übernacht-Inkubation abzentrifugiert, 1 x in PBS gewaschen und in 5 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde einer Ultraschallbehandlung (Sonifier 250, Branson) im Eisbad bis zum Aufklaren und dem Verschwinden der Viskosität unterzogen. Nach Zentrifugation bei 5.000 x g für 20 min wurde der Überstand sterilfiltriert und die Proteinkonzentration bestimmt. Eine Stammlösung mit ca. 12 mg Protein/ml diente für alle Versuche zur Beschichtung der Platten. Sie wurde in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.8 Primärzellkulturen aus Mäusemilzen

Für den Transport oder zur Aufbewahrung wurden die Mäusemilzen in PBS mit Antibiotika (AB) eingelegt (Eppendorf-Reaktionsgefäße) und waren so bei 4 °C für mind. 6 h lagerfähig.

---

<sup>45</sup> Sekundärantikörper von BD PharMingen, BD Biosciences #554002

<sup>46</sup> Biodesign, Saco #W99035P

<sup>47</sup> Sekundärantikörper von ICN Biochemicals, Eschwege, #55549

<sup>48</sup> BD Biosciences, #550588

<sup>49</sup> Sekundärantikörper von Sigma, Steinheim, A-2304

<sup>50</sup> BD Biosciences #anti IgG1 #559626, anti IgG2a #553391

### Verwendete Medien und Materialien:

Medium:       - 50 % DMEM<sup>51</sup> mit 4 mM N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine  
                  - 50 % RPMI 1640<sup>52</sup> mit 2 mM N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine  
                  (Endkonzentration für Glutamin: 3 mM)  
                  - 10 % FKS  
                  - 50 µM β-Mercaptoethanol<sup>53</sup> (1.75 µl pro 500 ml)  
                  - 50 U/ml Penicillin<sup>54</sup>  
                  - 100 µg/ml Streptomycin<sup>55</sup>  
                  - 0.2 µg/ml Amphotericin B<sup>56</sup>

PBS mit AB:    PBS mit           50 U/ml Penicillin  
  100 µg/ml Streptomycin  
  0.2 µg/ml Amphotericin B

### Materialien:

sterile 6 cm Plastikpetrischälchen, Einwegskalpelle, 5 ml Einwegspritzen, Platinöse, Bunsenbrenner, 15 ml Zentrifugenröhrchen, 2 ml Reaktionsgefäße

### Vorgehensweise:

- Unter der Sterilwerkbank die Milz in 6 cm Plastikpetrischälchen geben und mit Skalpell aufschlitzen,
- ca. 2-3 ml PBS zugeben und Zellen mit Platinöse aus der Milz herausquetschen,
- zwischen verschiedenen Organen die Öse in 70 % Ethanol tauchen und kurz abflammen,
- Zellen durch mehrmaliges auf- und abziehen durch die 5 ml Einwegspritze ohne Kanüle suspendieren,
- Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen geben und große Gewebestücke ca. 5 min absetzen lassen,
- Zellen in steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführen (dabei größere Gewebestücke zurücklassen) und bei 400 x g, 10 min, abzentrifugieren,
- Überstand abnehmen und verwerfen,
- Pellet vorsichtig (nicht durch dünne Pipettenspitze ziehen, nicht vortexen, nur Finger schnippen) in Medium aufnehmen und nochmals abzentrifugieren,

---

<sup>51</sup> Life Technologies, Gibco BRL, GB #31885-023

<sup>52</sup> Invitrogen, Karlsruhe #21875-034

<sup>53</sup> Merck, Darmstadt #115433

<sup>54</sup> Biochrom, Berlin #A321-42

<sup>55</sup> Biochrom, Berlin #A331-27

<sup>56</sup> Sebak, Aldenbach #31-0104

- Pellet erneut in Medium aufnehmen und photometrisch die Dichte bestimmen (z. B. 1:10 in Medium verdünnt). Eine OD bei 600 nm von 0.1 entspricht ungefähr  $2 \times 10^6$  Zellen/ml.

Zur Bestimmung der Anzahl lebender gegenüber toter Zellen wurden diese zu Beginn und am Ende der Kulturzeiten nach Färbung eines Aliquots mit Trypan Blau (10 Teile Medium oder PBS, 1 Teil Trypan Blau) unter dem Mikroskop ausgezählt.

### **3.9 *In vitro* Stimulation von Milzzellen zur Induktion von IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-5**

Die Inkubation erfolgte in 96-Mikrowell U-Platten<sup>57</sup>. Alle Proben wurden als Duplikate angelegt.

- 100  $\mu$ l Medium (s. Kapitel 2.11) mit 10  $\mu$ g/ml rPA83 pro Vertiefung vorlegen. Als Negativkontrolle diente Medium ohne PA.
- Ca.  $1 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung in 100  $\mu$ l Medium zugeben.
- Zu gegebenen Zeitpunkten (Angaben im Ergebnisteil) vorsichtig den Zellüberstand (nur ca. 120  $\mu$ l) abpipettieren, in eine neue Platte geben und bei  $-20$  °C lagern. Der Zellüberstand konnte direkt im ELISA getestet werden.

Für die Restimulation der Zellen wurde das Volumen mit Medium wieder aufgefüllt (jeweils mit und ohne rPA) und der Zellüberstand zu einem späterem Zeitpunkt erneut abgenommen (z. B. Restimulation nach 60 h und endgültige Messung 192 h nach Restimulation, für IL-4 und IL-5).

### **3.10 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Milzzellkulturüberständen**

Die Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand wurden mit Hilfe von ELISA-Kits der Firma Pharmingen<sup>58</sup> bestimmt. Grundlage der Messung waren die Standardkurven der im Kit mitgelieferten Referenzsubstanzen. Die Auswertung der Meßreihen für die Standardkurven erfolgte mit der Ascent-Software<sup>10</sup>.

### **3.11 Bestimmung des Toxin-Neutralisationstiter**

Die Methode wurde nach den publizierten Angaben aus dem USAMRIID<sup>59</sup> für die eigenen Laborbedingungen optimiert. Die eingesetzten Konzentrationen für PA<sup>60</sup> und LF<sup>61</sup> können

---

<sup>57</sup> Nunc, Wiesbaden

<sup>58</sup> OPT EIA: mouse IL-4 #555232, mouse IL-5 #555236, mouse IFN- $\gamma$  #2612KI

<sup>59</sup> USA Medical Res. Inst. Infect. Dis.

abhängig von der jeweiligen Charge der Proteine schwanken und müssen bei Chargenwechsel auf der Basis bekannter positiver und negativer Testseren neu justiert werden.

Aus den beiden Toxinkomponenten wurde eine Mischung in DMEM + 5 % FKS vorbereitet und auf Eis gestellt. Die Mischung enthielt 500 ng/ml PA83 und 100 ng/ml LF.

Die zu testenden Seren wurden zunächst bei 55 °C für 30 min hitzeinaktiviert und dann in DMEM und RPMI (je 50 %) mit 5 % FKS in log<sub>2</sub> Stufen verdünnt. Zu je 100 µl Serum jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µl der PA/LF Lösung in eine Mikrotiterplatte gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert.

J774A.1 Zellen wurden in 200 µl Kulturmedium (DMEM und RPMI, je 50 %) mit 5 % FKS auf sterile 96-well Platten gegeben und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Das Medium der Zellen wurde durch 100 µl des vorinkubierten Serum/Toxin Gemisches ersetzt und weitere 4 h bei 37 °C inkubiert. In jedem Test wurden folgende Kontrollen mitgeführt: nur Serum (höchste Konzentration) ohne Toxin als Serumkontrolle, nur Toxin ohne Serum als Toxinkontrolle, nur Kulturmedium ohne Toxin als Mediumkontrolle und eine Verdünnungsreihe eines gepoolten hochtitrigen Serumgemisches als positive Plattenkontrolle. Alle Kontrollen und Testseren wurden im Doppelansatz gemessen. Nach der 4stündigen Inkubation wurden 25 µl MTT Lösung (5 mg/ml in PBS<sup>62</sup>) zu allen Vertiefungen gegeben (Endkonzentration 1 mg/ml) und die Zellen nochmals 2 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Während dieser Zeit wird MTT von lebenden Zellen umgesetzt und bildet den dunkelvioletten Farbstoff Formazan. Schließlich wurden die Zellen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren lysiert. Als Lyselösung diente ein Gemisch aus 90 % n-Propanol, 0,5 % SDS und 25 mM HCl. Die optische Dichte wurde im ELISA reader bei 540 nm abgelesen, wobei die Toxinkontrollen als Nullwerte (blank) dienten und der Wert der Referenzwellenlänge von 690 nm abgezogen wurde. Die Toxinneutralisation in Prozent kann nach der Formel:  $P = (\text{Probe} - \text{Toxinkontrolle}) / (\text{Mediumkontrolle} - \text{Toxinkontrolle}) \times 100$  ermittelt werden. Der Neutralisationstiter (NT<sub>50</sub>) entspricht dem reziproken Wert der Serumsverdünnung, die 50 % des zytotoxischen Effekts des Letaltoxins neutralisiert. Diese Verdünnungsstufe wurde mit Hilfe des SigmaPlot Regression Wizard (4-parameter sigmoid regression curve) berechnet. Als Akzeptanzkriterien für einen Test galten: r<sup>2</sup> der Regressionskurve bei >0.9 und ein NT<sub>50</sub> des mitgeführten Positivkontrollserums mit einer maximalen Abweichung von ± ½ Titerstufe (siehe auch Hering et al., 2004).

---

<sup>60</sup> List Biological Laboratories, CA, #171

<sup>61</sup> List Biological Laboratories, #172

<sup>62</sup> Sigma, #2128

### 3.12 Zellproliferationstest in Blutleukozyten

Medium: 50 % DMEM (mit 4 mM N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine)  
50 % RPMI 1640 (mit 2 mM N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine)  
(Endkonzentration Glutamin: 3 mM)  
10 % FKS  
50 µM β-Mercaptoethanol (1.75 µl pro 500 ml)  
50 U/ml Penicillin (Stammlsg. mit 100 000 U/ml)  
100 µg/ml Streptomycin (Stammlsg. 250 mg/ml)  
0.2 µg/ml Amphotericin B (250 µg/ml)

PBS mit Antibiotikum (AB): PBS, 50 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin  
0.2 µg/ml Amphotericin B

#### Protokoll:

1. 5 ml EDTA oder heparinisiertes Vollblut mit 5 ml PBS + AB verdünnen.
2. In einem 50 ml Röhrchen 8 ml Biocoll (Biochrom, Berlin)<sup>63</sup> vorlegen und vorsichtig mit dem verdünnten Blut überschichten. Alle Lösungen sollten Raumtemperatur haben!
3. Zentrifugation bei 1200 x g, 20 °C für 20 min.
4. Zellen der Interphaseschicht zwischen Plasma und Biocoll abnehmen und mit PBS + AB und 1 mM EDTA waschen (300 x g, 20 °C, 15 min).
5. Zellen 2 x mit Medium waschen und zählen.
6. 1-3 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Vertiefung einer 96-Well Rundboden-Platte geben und mit 0.5 µg/Vertiefung ConA<sup>64</sup> bzw. 1 µg/Vertiefung rPA83 stimulieren; Endvolumen 200 µl Medium pro Vertiefung.
7. Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.
8. Nach 72 h Inkubation 20 µl BrdU Lösung (Labeling and Detection Kit III, Roche)<sup>65</sup> zugeben und noch eine Nacht weiterinkubieren.

---

<sup>63</sup> #L6113

<sup>64</sup> Sigma #C2010

<sup>65</sup> Roche Applied Science, #11444611001

9. Am nächsten Morgen 100 µl der Zellen in eine Nunc Immunoplatte mit Flachboden-Vertiefungen überführen und dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll für Suspensionskulturen folgend fixieren und entwickeln.

### 3.13 Transfektion von Cos-7 Zellen in Mikrotiterplatten

Cos-7 Zellen werden am Tag vor der Transfektion ausgesät, 2-6 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Kavität in 100 µl DMEM mit 5 % FKS. Die Zellen sollten 90-95 % Konfluenz erreichen.

1. Pro Kavität 1 µl Lipofectamin<sup>66</sup> mit 24 µl OptiMEM<sup>67</sup> mischen und 5 min bei RT inkubieren.
2. Pro Kavität 0,32 µg pDNA in insgesamt 25 µl OptiMEM mischen und zu der Lipofectamin/OptiMEM Mixtur geben, 20 min bei RT inkubieren.
3. Altes Medium von den Zellen abziehen und durch 100 µl frisches DMEM ohne FKS und ohne Antibiotika ersetzen, danach pro Kavität 50 µl Transfektionsgemisch zugeben.
4. Platte ca. 10 sec. auf einem Plattenrüttler bewegen.
5. Inkubation für 6 h im Zellkulturbrutschrank, danach das Medium abziehen und durch 200 µl DMEM + 5 % FKS mit Antibiotika (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B) ersetzen.
6. Inkubation für 24 bis 72 h im Zellkulturbrutschrank, danach Zellen fixieren und färben.

### 3.14 Immunfärbung transfizierter Cos-7 Zellen

Lösungen: 80 % Ethanol  
PBS  
Citrat-Phosphat-Puffer: (0,3 mM Zitronensäure, 167 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5,0)  
Aminoethylcarbazollösung<sup>68</sup>: (10 mg/ml in Ethanol)  
AEC-Lsg.: 200 µl Aminoethylcarbazollösung, 10 µl 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 ml Citrat-Phosphat-Puffer

#### Verwendete Antikörper:

**anti PA:** mAk anti-PA, Clone C3<sup>69</sup>, 1:500 in PBS, 10 % FKS,

---

<sup>66</sup> Gibco BRL, Paisley, UK, #11668-027

<sup>67</sup> Gibco BRL, Paisley, UK, # 31985-039

<sup>68</sup> Sigma A5754

<sup>69</sup> Biodesign International, USA #C86613M

polyklonales anti-Maus IgG-POD Konjugat, 1:500 in PBS, 10 % FKS  
oder anti-Maus Immunglobulin POD Konjugat<sup>70</sup>, 1:500 in PBS, 10 % FKS.

**anti myc:** mAk anti-myc<sup>71</sup> (1:100 in PBS, 10 % FKS)

polyklonales anti-Maus IgG-POD (1:500 in PBS, 10 % FKS)

**anti BclA:**

mAk anti-BclA (M. Mock, Institut Pasteur, Paris), (1:500 in PBS 10 % FKS)

polyklonales anti-Maus IgG-POD, (1:500 in PBS 10 % FKS)

Vorgehensweise:

1. Medium von den Zellen abziehen und 1x mit PBS waschen.
2. Zellen mit 80 % Ethanol (200 µl pro Vertiefung) fixieren, 10 min bei 37 °C.
3. Danach Ethanol abpipettieren und Platte 30 min bei RT trocknen.
4. Zellen mit 100 µl spezifischem Antikörper in PBS mit 10 % FKS für 1 h bei 37 °C inkubieren.
5. Vertiefungen 3x mit PBS waschen und mit dem sekundären Ak-Konjugat für 1 h bei 37 °C inkubieren.
6. Vertiefung 3x mit PBS waschen.
7. Pro Vertiefung 200 µl AEC-Lösung zugeben und 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren.
8. Vertiefungen 3x mit H<sub>2</sub>O waschen und unter H<sub>2</sub>O oder PBS unter dem Mikroskop auswerten.

Kontrollplasmide

Für alle verwendeten eukaryontischen Expressionsvektoren wurden vom Hersteller Varianten mit einem Kontrollmarker mitgeliefert, um den Transfektionserfolg zu beurteilen:

pCMV/ER/GFP

---

<sup>70</sup> Sigma #A0412

<sup>71</sup> Invitrogen, #46-0603

Zellen, die erfolgreich mit diesem Vektor transfiziert wurden, exprimierten das Protein GFP (Green Fluorescent Protein). Dieses konnte direkt mit dem Fluoreszenz-Mikroskop unter UV-Licht nachgewiesen werden.

#### pcDNA4/lacZ

Zellen, die erfolgreich mit diesem Vektor transfiziert wurden, exprimierten das Enzym  $\beta$ -Galactosidase. Dieses konnte mittels einer entsprechenden Substratfärbung nachgewiesen werden.

#### Galactosidase-Färbung:

Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen auf den Platten 3x vorsichtig mit warmem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit Fixiermittel (50 % Aceton/50% Methanol) überschichtet und 10 min bei RT inkubiert. Nachdem das Fixiermittel mit einer Pipette quantitativ entfernt worden war, wurden die Platten 3x mit PBS gewaschen und dann mit Färbelösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für minimal 30 min, wobei das Färbeergebnis mit zunehmender Inkubationszeit besser wurde.

Färbelösung:            20  $\mu$ l Kalium-Ferrocyanid II<sup>72</sup> (300 mM)  
                              20  $\mu$ l Kalium-Ferrocyanid III<sup>73</sup> (300 mM)  
                              20  $\mu$ l X-Gal<sup>74</sup> (5 mg/ml in Dimethylformamid<sup>75</sup>)  
                              2 ml PBS  
                              2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub><sup>76</sup> (1 M)

#### pSeqTag2/PSA

Zum Nachweis transfizierter Zellen wurde das exprimierte myc-Epitop mittels anti-myc Ak im Immunoblot detektiert.

---

<sup>72</sup> Roth, Karlsruhe; # 7974.1

<sup>73</sup> Roth, Karlsruhe; # 7971.1

<sup>74</sup> Roth, Karlsruhe; # 2315.3

<sup>75</sup> Roth, Karlsruhe; # 6251.2

<sup>76</sup> Merck, Darmstadt; # A206433

### 3.15 Herstellung der Sporensuspensionen für *B. anthracis*

Die Präparation folgte einem genormten Protokoll (prEN 13697:2000) zur Herstellung von *Bacillus* Sporen mit eigenen Modifikationen. Diese betreffen insbesondere die verwendeten Kulturgefäße, die Methode zur Abtötung vegetativer Keime und die verwendete Waschlösung.

Der TGB-Nährboden wird mit etwa  $10^6$  Sporen aus einer zuvor hergestellten Charge beimpft und bei 30 °C bebrütet, um eine Kultur in der exponentiellen Wachstumsstufe mit etwa  $10^7$  Bazillen je Milliliter zu erhalten. 2 bis 3 ml dieser Kultur werden in eine Roux-Flasche mit MYA (siehe unten) übertragen und mehrere Male geneigt, sodaß die Impfkultur mit der gesamten Oberfläche des Agar in Berührung kommt. Überschüssige Impfkultur wird entfernt. Die Flasche wird bei 30 °C bebrütet. Nach dem dritten Bebrütungstag wird der Zustand der Kultur unter einem Mikroskop, vorzugsweise einem Phasenkontrastmikroskop, bewertet. Bei fehlender Sporenbildung sollte von vorn begonnen werden. Die Bebrütung wird fortgesetzt, bis sich die vegetativen Zellen aufgelöst haben (8 bis 10 Tage). Die Kulturen werden durch Abschwemmen in Wasser wiedergewonnen. Nach Zentrifugation wird das Pellet in 65 % Isopropanol aufgenommen und 2-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für den nächsten Zentrifugationsschritt wird die Suspension mit  $\frac{1}{2}$  Volumen Wasser verdünnt. Danach werden die Sporen 5 x in NaCl (0,9 % mit 0,1 % Gelatine) gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgt in der letzten Resuspension in gewünschter Konzentration, bei 4 °C.

Zur Reinheitskontrolle und Keimzählung wird die Sporensuspension gut gemischt und nach dem Oberflächenverfahren auf Blutagar<sup>77</sup> ausplattiert. Ferner wird zur Kontrolle des vegetativen Anteils eine Sporenfärbung nach Rakette hergestellt und mehrere Objektträgerausstriche (10 pro 100 ml Sporensuspension) überprüft. Bei gelungener Präparation liegt der vegetative Anteil unter 1 % bzw. ist nicht nachweisbar

#### Trypton-Glucose-Bouillon (TGB) zur Herstellung der Impfkultur von *Bacillus* Sporen:

Hefeextrakt	2,5 g
Trypton	5,0 g
Glucose	1,0 g
Wasser	ad 1 Liter

Die Bouillon wird in Portionen von je 10 ml in Prüfröhrchen gegeben und im Autoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisation muß der pH-Wert des Mediums 7,2, gemessen bei 20 °C, betragen.

---

<sup>77</sup> Merck, Darmstadt #110455

### Hefeextrakt-Agar (MYA) zur Herstellung von *Bacillus* Sporen:

Fleischextrakt	10,00 g	Agar	15,00 g
Hefeextrakt	2,00 g	Wasser	ad 1 Liter
MnSO <sub>4</sub> x 1H <sub>2</sub> O <sup>78</sup>	0,04 g		

Der autoklavierte Agar wird in Roux-Flaschen oder Zellkulturflaschen oder in Petrischalen (30 ml bei 14 cm Ø) gegeben. Nach der Sterilisation muß der pH-Wert des Mediums 7,0, gemessen bei 20 °C, betragen.

## **3.16 Immunisierung von Versuchstieren**

### **3.16.1 Orale Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen**

Für die orale Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen wurden Reisolat aus den inneren Organen eines Versuchstieres, 3 Tage nach oraler Applikation, gewonnen. Damit sollte sichergestellt werden, daß die verwendeten Klone keine artifiziellen Defekte in ihrer Invasivität und Fähigkeit zur Replikation im Tier tragen. Mehrere Reisolat von jedem Konstrukt wurden auf Veränderungen in ihrer Generationszeit im Vergleich zum Vakzine-Ausgangsstamm, die Expression und den Export des Fusionsproteins sowie auf die Stabilität der verwendeten Plasmide getestet. Jeweils 1 Isolat mit einer optimalen Kombination der 3 getesteten Parameter wurde für die Immunisierung selektiert.

### Anzucht der Impfstämme:

- Anzucht der Salmonellen über Nacht (ÜN) in 5 ml Standard I-Bouillon oder Luria-Bertani-Medium (LB), (Sambrook et al., 1989), mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C,
- Überimpfen von 1/100 Volumen der ÜN Kultur in vorgewärmtes Medium mit Antibiotika und Inkubation bei 37 °C bis zur OD<sub>600nm</sub> = 1.0,
- Kultur abzentrifugieren, 3000 x g, 10 min, RT,
- Pellet im halben Ausgangsvolumen mit PBS resuspendieren, RT,
- abzentrifugieren, 3000 x g, 10 min, RT,
- Pellet in PBS, 0,01 % Gelatine so resuspendieren, daß Impfportionen von 20 – 50 µl mit 10<sup>9</sup> – 10<sup>10</sup> KBE (für die Versuche unterschiedlich und dort jeweils angegeben) entstehen.

Alle Kulturen wurden sofort in log10-Stufen in physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und zur Ermittlung der tatsächlichen KBE auf Standard I-Agar<sup>79</sup> ausplattiert.

---

<sup>78</sup> Merck, Darmstadt #159265

<sup>79</sup> Merck, #1.07881.5000

### Impfung:

Den Tieren wurde Futter und Wasser für ca. 4 h vor der Impfung entzogen. Die Impfdosen wurden entweder per Knopfkanüle in den unteren Ösophagus verabreicht oder mit einer Pipettenspitze verfüttert (bei den jeweiligen Versuchen angegeben). Bei Verfütterung wurden jeder Maus zunächst 20 µl 10 % Bicarbonat, dann ca. 30 min später 20 µl Salmonellensuspension verabreicht. Bei Installation per Knopfkanüle war 10 % Bicarbonat als Bestandteil der Salmonellen-Suspension vorhanden.

### **3.16.2 DNA-Vakzinierung - intramuskulär**

Gruppen von etwa 7 Wochen alten weiblichen Balb/c-Mäusen wurden 1 Tag vor der Immunisierung an den Hinterbeinen mittels Creme „Pilca“ enthaart.

Zur Immunisierung wurden die Tiere kurzzeitig mit Isofluran (Curamed) betäubt. Die Applikation der DNA-Lösung erfolgte mit einer 1 ml Einwegspritze, Nadeln Gr. 20 (27 G x 3/4"), mit abgeschnittener Plastikhülle als Abstandhalter (3-4 mm). Die Versuchsgruppen erhielten 2 x 50 µg (in 2 x 50 µl PBS) DNA, i. m., in die *Mm. tibialaes anterior*.

Die negative Kontrolle erhielt 2 x 50 µl PBS (tissue culture grade; Gibco) in gleicher Weise.

Die positive Kontrolle erhielt 400 µl der azellulären Humanvakzine AVA, s. c. (Lot FAV 037 und LOT FAV 016).

Die Immunisierung wurde 2x im Abstand von 14 Tagen wiederholt.

Die Tötung erfolgte 4 Wochen nach der letzten Immunisierung mittels CO<sub>2</sub> unter Blutentzug aus dem Herzen.

### **3.16.3 DNA-Vakzinierung mit der „Gene gun“**

Die Plasmid DNA der eukaryontischen Expressionsplasmide wurde mit den Kits Nucleobond PC2000-EF oder PC10000-EF<sup>80</sup> der Firma Macherey Nagel (Düren) oder einem Plasmid Midi/Maxi-Kit der Firma Qiagen isoliert, auf einem Agarosegel auf Reinheit und Konfiguration kontrolliert und auf die Konzentration von ca. 1 µg/µl in TE Puffer eingestellt. Die DNA wurde auf 1,6 micron Goldcarrier (BioRad, München) präzipitiert, wobei prinzipiell der Anleitung für das Helios Gene Gun System (BioRad) gefolgt wurde. Das folgende Protokoll stellt eine Optimierung der Empfehlungen des Herstellers dar, die zu einer gleichmäßigeren und dichteren Beschichtung der Schlauchpatronen führt und damit zu höheren DNA-Konzentrationen pro Patrone (bis zu 3 µg DNA).

---

<sup>80</sup> #740549

### Herstellung der DNA-Lösungen und Beschichtung der Goldpartikel:

1. PVP-Stocklösung: 10 mg/ml PVP in reinstem Ethanol in Eppendorf-Reaktionsgefäß, frisch angesetzt.  
PVP-Gebrauchsverdünnung von 0,1 mg/ml: 40 µl PVP-Stocklösung in 4 ml reinstes Ethanol.  
Deckel geschlossen halten!
2. 30 mg Gold in Eppendorf-Reaktionsgefäß einwiegen.
3. Zugabe von 250 µl 0,05 M Spermidin<sup>81</sup> zu den Goldpartikeln.
4. Vortexen für 10 sec.
5. Beschallen für 5 Sekunden im Ultraschallbad.
6. Zugabe von 150 µl DNA-Lösung (150 µg).
7. Vortexen für 5 Sekunden.
8. Tropfenweise Zugabe von 250 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung, während das Gemisch bei moderater Geschwindigkeit weiter gevortext wird.
9. 10 min bei RT präzipitieren lassen.
10. Zentrifugation für 15 s, um das Gold vollständig zu pelletieren.
11. Überstand mit Pipette abnehmen und verwerfen.
12. Pellet 5x mit je 1 ml 100 % Ethanol waschen, zwischen den Waschschrritten anzentrifugieren. Überstand mit Pipette abnehmen und verwerfen.
13. Resuspendieren des Pellets in ein Zentrifugenröhrchen in 500 µl-Schritten mit verdünnter (0,1 mg/ml) PVP-Lösung, bis zum Endvolumen von 3 ml.
14. Weiterverwendung zur Schlauchpräparation oder Lagerung bei -20 °C. Zur Lagerung den Deckel fest zuschrauben und mit Parafilm umwickeln. Die Präparation ist bis zu 2 Monaten lagerbar.

Auftauen: Vor dem Öffnen des Gefäßes muß sich der Inhalt auf Raumtemperatur erwärmt haben, um Kondenswasserbildung zu vermeiden.

### Herstellung der DNA-Patronen:

1. Tefzel-Schlauch mindestens 15 min mit Stickstoff spülen.
2. Danach geeignete Schlauchlänge an eine Spritze spannen und mit absolutem EtOH spülen.

---

<sup>81</sup> Sigma #S2626

3. Goldpräparation unmittelbar vor der Schlauchbeschichtung kurz im Ultraschallbad beschallen (2x ca. 3 sec).
4. Goldpräparation aufsaugen, Schlauchende mit Papiertuch abwischen und in die Schlauch-Station einspannen.
5. Mit der Suspension im Schlauch für 5 min in 30 sec. Abständen jeweils  $\frac{1}{4}$  Umdrehung rotieren lassen, zum Schluß für 30 sec absetzen lassen.
6. Den Überstand langsam mit einer Schlauchpumpe abziehen.
7. Für insgesamt 5 min mit Stickstoff trocknen, dabei den Luftstrom langsam auf bis zu 3-4 Liter pro Minute erhöhen.
8. Nach optischer Kontrolle des Schlauches geeignete Stücke markieren und mittels Schlauchschneider die Patronen zurechtschneiden.
9. Patronen mit Trockenmittel und Parafilm umwickelt im Kühlschrank aufbewahren (bis zu 8 Monaten, laut Angaben von BioRad). Vor dem Öffnen des Gefäßes muß sich der Inhalt auf Raumtemperatur erwärmt haben, um Kondenswasserbildung zu vermeiden.
10. Zur Qualitätskontrolle je 3 Patronen mit 200  $\mu$ l TE Puffer spülen, das Eluat auf 1 ml auffüllen und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmen. Von dieser Lösung 20  $\mu$ l auf einem Agarosegel auftrennen zur Beurteilung der Plasmid-DNA Konfiguration. Zusätzlich werden je 2 Patronen von jeder Präparation zur Probe auf Filterpapier verschossen, um die Ablösbarkeit der Goldpartikel von der Schlauchwand zu prüfen.

#### Impfung von Mäusen mit der „Gene Gun“:

Das Abdomen der anästhesierten Mäuse wurde ein bis zwei Tage vor der 1. Immunisierung mit Einwegrasierklingen rasiert. Zur Immunisierung wurden die Tiere erneut anästhesiert, die Bauchfläche endgültig rasiert und mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Die mit DNA beschichteten Goldcarrier wurden mit 200 bis 400 psi Heliumdruck mittels Helios Gene Gun (BioRad) senkrecht auf die nackten Hautstellen geschossen. Die Zeitpunkte und die Dosis der Immunisierungen werden bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

#### **3.16.4 Immunisierung mit rekombinantem PA und Adjuvantien**

Für die Immunisierung von NMRI-Mäusen mit rPA83 und den Adjuvantien Alhydrogel (Ah) bzw. Lipopeptid (LP) wurden die folgenden Mischungen hergestellt:

Ah/LP: Je 200 µl Dosis: 15 % iges Alhydrogel<sup>82</sup>, entspricht 1.6 mg/ml Al, ausgehend von einer 2 %igen Alhydrogel Lösung mit 10.4 mg/ml Al in EF-PBS<sup>83</sup> und 50 µg Lipopeptid<sup>84</sup>

Die Mischung ergibt sich aus:

- 1,25 ml EF-PBS,
- + 1,25 ml 60 % Alhydrogel (0,77 ml 2 %iges Ah plus 0,48 ml EF-PBS),  
⇒ bei 4 °C über Nacht inkubieren,
- + 2,5 ml Lipopeptidlösung (mit EF-PBS auf 0,5 mg/ml eingestellt),
- ergibt 5 ml (entspricht 25 Dosen).

Ah/LP rPA: Je 200 µl Dosis: 25 µg rPA83 (ca. für 2 Tage bei 4 °C an Alhydrogel adsorbiert) und 50 µg Lipopeptid in EF-PBS.

Die Mischung ergibt sich aus:

- 1,25 ml rPA83 (0,5 mg/ml) in EF-PBS,
- + 1,25 ml 60 % Alhydrogel (0,77 ml 2 %iges Ah plus 0,48 ml EF-PBS),  
⇒ bei 4 °C über Nacht inkubieren,
- + 2,5 ml Lipopeptidlösung (mit EF-PBS auf 0,5 mg/ml eingestellt),
- ergibt 5 ml (entspricht 25 Dosen).

LP rPA: Je 200 µl Dosis: 50 µg Lipopeptid und 25 µg rPA83 in EF-PBS.

Die Mischung ergibt sich aus:

- 1,25 ml rPA83 (0,5 mg/ml) in EF-PBS,
- + 1,25 ml EF-PBS,
- + 2,5 ml Lipopeptidlösung (mit EF-PBS auf 0,5 mg/ml eingestellt),
- ergibt 5 ml (entspricht 25 Dosen).

NA: Je 200 µl Dosis: 15 % iges Alhydrogel, entspricht 1,6 mg/ml Al, ausgehend von einer 2 %igen Alhydrogel Lösung mit 10,4 mg/ml Al in EF-PBS.

Die Mischung ergibt sich aus:

- 2,55 ml EF-PBS,

---

<sup>82</sup> Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark

<sup>83</sup> Sigma, Dulbecco's PBS Endotoxin geprüft #1679

<sup>84</sup> EMC Microcollections, Tübingen, Germany

+ 0,45 ml Alhydrogel (2 %ig),  
→ bei 4 °C über Nacht inkubieren,  
- ergibt 3 ml (entspricht 15 Dosen).

NL: Je 200 µl Dosis: 50 µg Lipopeptid in 200 µl EF-PBS.

Die Mischung ergibt sich aus:

2,25 ml EF-PBS,  
+ 0,75 ml Lipopeptidlösung (mit EF-PBS auf 1 mg/ml eingestellt),  
- ergibt 3 ml (entspricht 15 Dosen).

Ah: Je 200 µl Dosis: 25 µg rPA83 (übers Wochenende bei 4 °C an 15 %iges Alhydrogel in EF-PBS adsorbiert).

Die Mischung ergibt sich aus:

1,5 ml rPA83 (0.25 mg/ml) in 5 mM HEPES pH 7,5,  
+ 1,05 ml EF-PBS,  
+ 0,45 ml Alhydrogel (2 %ig),  
→ bei 4 °C über Nacht inkubieren,  
- ergibt 3 ml (entspricht 15 Dosen).

LP und P: Je 200 µl Dosis: 25 µg rPA83 und 50 µg Lipopeptid in 200 µl EF-PBS

Die Mischung ergibt sich aus:

3 ml rPA83 (0,25 mg/ml) in 5 mM HEPES, pH 7,5,  
+ 1,5 ml EF-PBS,  
+ 1,5 ml Lipopeptidlösung (mit EF-PBS auf 1 mg/ml eingestellt),  
- ergibt 3 ml (entspricht 30 Dosen)

### **3.17 Belastungsinfektionen mit Lebendsporen von *B. anthracis***

Sporen des russischen Vakzinestammes STI wurden einer Originalampulle ( $10^9$  Sporen/ml) entnommen und in NaCl mit 0.1 % Gelatine auf  $10^6$  bzw.  $10^7$  KBE/ml verdünnt. 100 µl dieser Suspension wurden den manuell fixierten, nicht narkotisierten Mäusen i. p., von kaudo- nach cranio-ventral injiziert. Sporen des Stammes Ames wurden in gleicher Weise verdünnt. Die Aufbewahrung dieser Gebrauchsverdünnungen erfolgte in silikonisierten Glasröhrchen. Die Anzahl lebender Sporen wurde vor jeder Versuchsserie und mit einem entsprechenden

Aliquot der im Versuch verabreichten Sporensuspension auf Blutplatten<sup>85</sup> bestimmt. Mäuse wurden mit Äther anästhesiert und die Dosis in 100-200 µl Volumen, s. c. am Rücken appliziert. Kaninchen wurden mit Diazepam ruhig gestellt und die Dosis in 1 ml Volumen, s. c. in den Bereich zwischen die Schulterblätter appliziert.

### 3.18 Challenge mit Letaltoxin

Rekombinantes PA und LF (beide von List Biological Laboratories, CA, USA) wurden in verschiedenen Konzentrationen in HEPES Puffer<sup>86</sup>, pH 7,4 verdünnt und den manuell fixierten Tieren in die Schwanzvene injiziert. Zur besseren Darstellung der Gefäße wurde der Schwanz zuvor mit Ethanol abgerieben.

### 3.19 Klonierung der prokaryontischen Expressionskassetten

Für die Klonierungen in prokaryontische Expressionskassetten wurde eine resynthetisierte Sequenz des PA-Gens mit einer für die Translation in *E. coli* optimierten Codon-Sequenz aus dem Plasmid p19PA (übernommen von R. Titball, Dstl, Porton Down; GenBank accession number AX353700, E.D. Williamson, J. Miller, and R.W. Titball, 8. Juli 2001, British Patent Office) benutzt. Die kodierende Region für das vollständige PA83 Protein (bp 1891-4095, Welkos et al., 1988, im weiteren als PA83ec bezeichnet) und für die physiologisch aktive Form PA63 (bp 2395-4095, Welkos et al., 1988, im weiteren als PA63ec bezeichnet) wurden amplifiziert (Primerpaar ecPABam und ecPASTopSal bzw. ecPA63Bam und ecPASTopSal) und in das Vektorplasmid pQE30 (Invitrogen, Niederlande) unter Nutzung der BamHI/SalI-Restriktionsorte kloniert. Dabei erhalten die Gene 5'seitig ein zusätzliches Peptid von 12 AS (MRGSHHHHHHGS). Das Protein PA83ec besteht daher aus 747 AS mit einer berechneten Größe von 83 kDa, PA63ec besteht aus 579 AS mit einer berechneten Größe von 64 kDa. Diese Rekombinanten, pQE30PA83ec und pQE30PA63ec, wurden für alle weiteren Subklonierungen verwendet.

Die Expressionskassetten, bestehend aus der T5-Promotorregion sowie der kodierenden Sequenz für PA83ec oder PA63ec wurden amplifiziert (Primerpaar pQEPAXho und ecPAendSma), das Amplicon mit den Enzymen XhoI und SmaI vedaut und die Fragmente in den Vektor pLG612-1B (bereitgestellt durch C.A. Guzman, GBF Braunschweig) mit den Restriktionsenzymen SalI - SmaI kloniert. Dabei entstand eine translationale Fusion des PA-Gens mit dem die Signalsequenz enthaltenden 3'-Ende der HlyA kodierenden Region aus *E.*

---

<sup>85</sup> Merck, #1.07881.5000

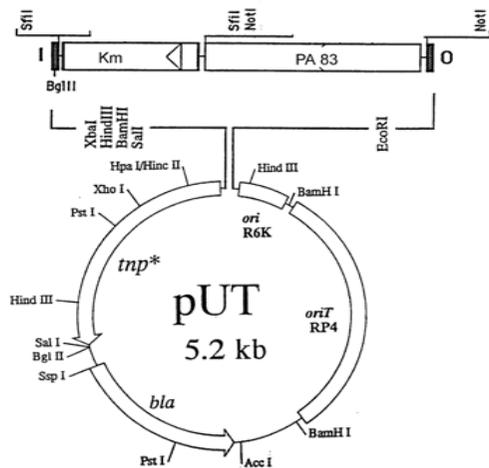
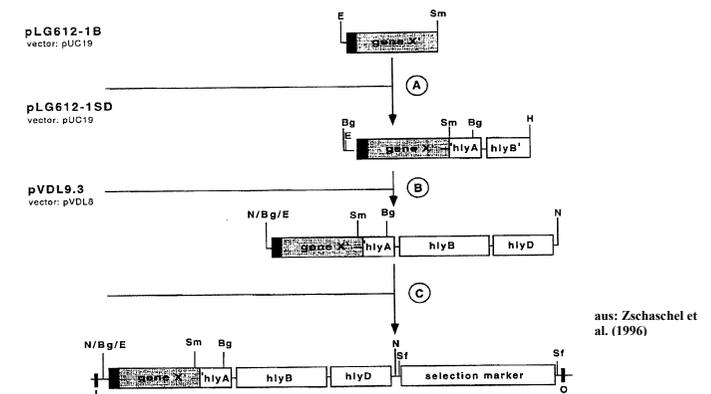
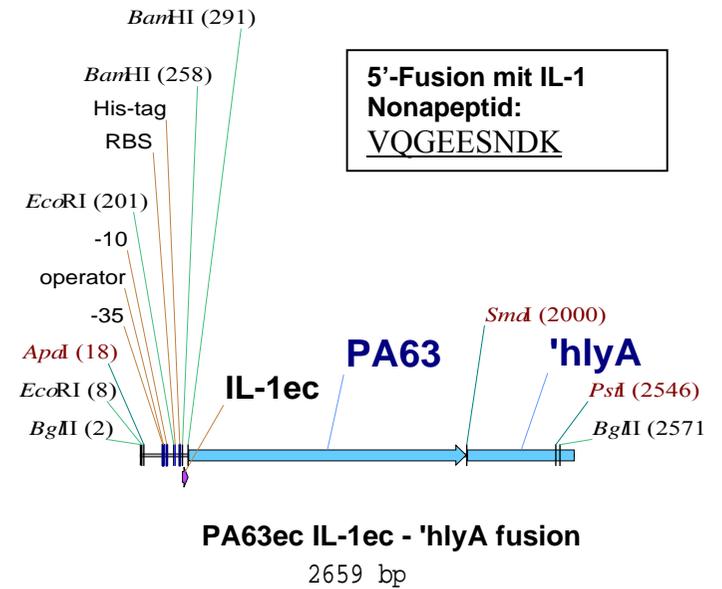
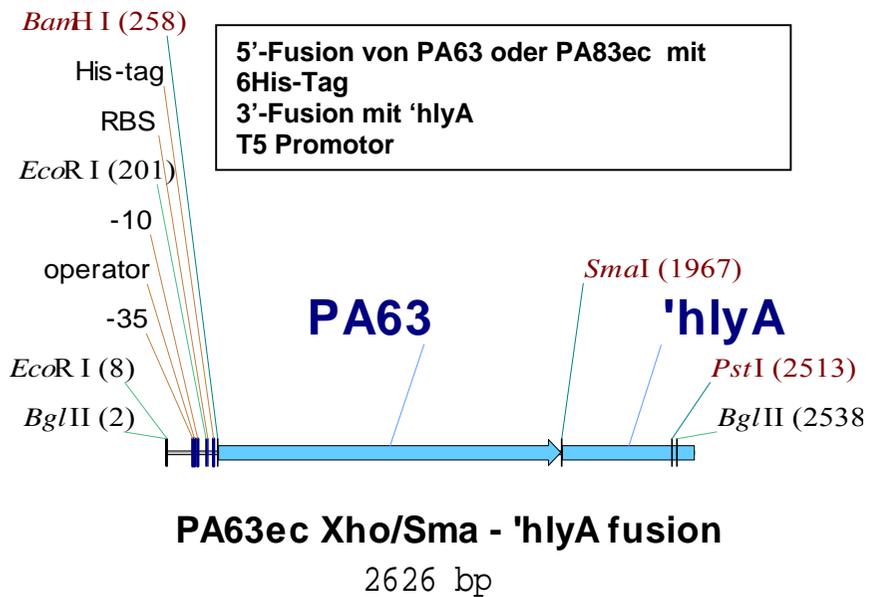
<sup>86</sup> Roth, Karlsruhe #9105.2

*coli* (Tzschaschel et al., 1996). Die Fusion an das 'hlyA-Fragment addiert weitere 220 AS an das 3'-Ende der inserierten Gene. Die vollständige Länge des exprimierten PA83ec-'HlyA Fusionsproteins beträgt daher 967 AS (107 kDa), die des PA63ec-'HlyA Fusionsproteins 799 AS (89 kDa). Diese Konstruktionen werden im weiteren mit pLG612PA83ec und pLG612PA63ec bezeichnet.

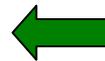
Die Expressionskassetten aus den entsprechenden Plasmiden pLG612-1B wurden als BglIII-Fragmente isoliert und in den Vektor pVDL9.3 subkloniert (bereitgestellt durch C. A. Guzman, Braunschweig). Dabei wurde die Exportkassette, nunmehr bestehend aus der entsprechenden PA-'hlyA Fusion sowie dem hlyB-Gen und hlyD-Gen von *E. coli* vervollständigt. Die entsprechenden Konstruktionen wurden pVDLpA83ec und pVDLPA63ec benannt. Die Funktion der Export-Kassetten wurde im *E. coli* TOP10F' überprüft. Um eine zusätzliche Fusion mit dem immunogenen Epitop des IL-1 Gens herzustellen, wurde das Plasmid pVDLPA63ec unmittelbar am 5'-Ende des PA63ec-Gens durch Verdau mit BamHI geöffnet. In diesen Restriktionsort wurde ein vorhybridisiertes und mit BamHI verdautes Oligonukleotid der Sequenz 5'-ATAGGATCCGTGCAGGGCGAAGAAAGCAACGATAAAGGATCCATA-3', das Nonapeptid VQGEESNDK umfassend, einkloniert.

Alle drei Expressionsvektoren wurden über die Zwischenstufe  $\chi$ 3730 (Typhimurium, r<sup>-</sup>, m<sup>+</sup>; bereitgestellt durch R. Curtiss III, Washington Univ.) in den auxotrophen (his<sup>-</sup>, ade<sup>-</sup>) Impfstamm Zoosaloral H (Impfstoffwerk Dessau/Tornau) überführt. Die resultierenden Konstruktionen wurden als **ZpVDLPA83ec**, **ZpVDLPA63ec** und **ZpVDLpA63ecIL-1ec** bezeichnet.

Für die Integration in das Chromosom von Salmonellen wurden die kompletten Export-Kassetten als NotI-Fragmente aus dem Vektor pVDL9.3 gewonnen und in den Transposon-Vektor miniTn5pUTKm integriert (de Lorenzo et al., 1990, 1994). Unter Nutzung des *E. coli* Stammes S17.1 $\lambda$ pir als Donor und Zoosaloral H als Rezipient wurden die rekombinanten Transposons in Salmonellen durch Konjugation übertragen. Transkonjuganten mit einer chromosomal integrierten Kopie des Transposons wurden durch Selektion auf Kanamycin haltigen Minimal-Nährmedien selektiert, die die Auxotrophien von Zoosaloral komplementieren. Die resultierenden Klone wurden als **ZpUTKmPA83ec**, **ZpUTKmPA63ec** und **ZpUTKmPA63ecIL-1ec** bezeichnet. Eine schematische Übersicht über die Klonierungsschritte enthält die Abb. 4.



aus: De Lorenzo und Timmis (1994)



**Konstruktion des Transposon Vectors für die Integration der Exportkassette in das Chromosom von Zoosaloral H: ZpUTKm PA63ec/PA83ec**

Abb. 4: Klonierungsschema für prokaryontische Expressionskassetten

Konstruktion der Exportkassette ZpVDL9.3 PA63ec oder PA83ec

### **3.20 Stabilitätstest für plasmidkodierte Expressionskassetten in Salmonellen**

Für die verschiedenen Expressionskassetten wurde die Plasmidstabilität in Zoosaloral H durch Subkultivierung *in vitro* ohne Antibiotika-Zusatz geprüft. Die Subkultivierung erfolgte 2x täglich durch Übertragung von 100 µl der Kultur in 10 ml frische, vorgewärmte Standard I-Nährbouillon<sup>87</sup> und Inkubation bei 37 °C unter Schütteln. Aus jeder Subkultur wurden 5 Verdünnungsstufen ausplattiert und die Anzahl der KBE verglichen.

### **3.21 Klonierung der eukaryontischen Expressionskassetten**

#### **3.21.1 Klonierung in pSecTag**

Der Vektor pSecTag (Invitrogen) enthält ein Signal zur Ausschleusung von Fusionsproteinen aus der transfizierten Zelle.

##### Expressionsplasmid pSecTag PA83

Konstruktbeschreibung: Aus der Plasmid-DNA von *B. anthracis*, Laborstamm A1, wurde ein 2204 bp-Fragment mittels PCR gewonnen (Primerpaar: PAKpnI und PArevApaI, Tab. 3). Das Fragment beinhaltet das PA-Gen ohne Signalsequenz und wurde in den Vektor pSecTag 2B, ApaI/KpnI-geschnitten, in 5'-Fusion mit der vektoreigenen Signalsequenz und 3'-Fusion mit dem c-myc Tag, kloniert.

##### Expressionsplasmid pSecTag-4ß8

Das unter dem Punkt 2.20.4 ausführlich beschriebene DNA-Fragment wurde nach Abänderung des 5'seitigen Klonierungortes nach HindIII in den eukaryontischen Expressionsvektor pSecTag 2B kloniert.

#### **3.21.2 Klonierung in pCMV/ER (Invitrogen)**

Der Vektor pCMV/ER enthält ein Retentionssignal, das exprimierte Proteine im ER zurückhält.

##### Expressionsplasmid pCMV/ER PA83

Konstruktbeschreibung: Der Vektor enthält das PA-Gen ohne Stop-Codon als 2205 bp großes PCR-Fragment (Primer: PAPauI und PAendNot, Tab. 3) aus pQE30PA83 B/S, kloniert in pCMV/myc/ER, PauI/NotI gespalten, als 5'-Fusion mit der ER-Signalsequenz und 3'-Fusion mit dem ER-Retentionssignal.

---

<sup>87</sup> Merck, #1.07882.0500

Der Vektor pQE30PA83 B/S enthält das Protektive Antigen (PA)-Gen ohne eigene Signalsequenz als 2342 bp-PCR-Fragment (Primer: PABam und PArevSal, s. Tab. 3), amplifiziert aus der Plasmid-DNA des Laborstammes A1 von *B. anthracis*, BamHI/Sall kloniert, unter der Kontrolle der pQE30-Regulationssequenzen.

#### Expressionsplasmid pCMV/ER PA63

Konstruktbeschreibung: Der Vektor enthält das PA-Gen aus pQE30PA B/S ohne Stop-Codon und ohne aminoterminalen 20 kDa-Peptid als 1700 bp großes PCR-Fragment (Primer: PA63PauI und PAend Not2), kloniert in die PauI-, NotI-Orte von pCMV/ER, in 5'-Fusion mit der ER-Signalsequenz und in 3'-Fusion mit dem ER-Retentionssignal.

#### Expressionsvektor pCMV/ERivcPAd4

Die Konstruktion dieser Expressionskassette erfolgte analog zur Beschreibung für pVAXivcPAd4 (Kap. 3.20.4) mit folgenden Änderungen: Das MHC Klasse II-Targeting-Signal der invarianten Kette der Maus wurde mittels der Primerkombination 5' ATAGCGCGCACTCCGATGACCAACGCGACC-3' und 5'- TATAAAGCTTCATGCGAAGGCTCTCCAGTTGC-3' amplifiziert und anschließend mit PauI und HindIII gespalten. Nach Ligation mit dem PAd4-Fragment wurde das entstandene Fusionsprodukt in den zuvor PauI-HindIII gespaltenen Vektor pCMV/ER ligiert und in *E. coli* K12 kloniert (im weiteren als pCMV/ERivcPAd4 bezeichnet). Der Vektor enthält das Insert ohne Start- aber mit Stop-Codon als 5'-Fusion mit der ER-Signalsequenz des Vektors (Abb. 10). Das mature Fusionsprotein besteht aus 218 AS.

Die Expression der Fusionsproteine wurde nach Transfektion von COS7-Zellen getestet.

### **3.21.3 Klonierung in pcDNA4 (Invitrogen)**

Die von diesem Vektor exprimierten Proteine verbleiben im Zytoplasma.

#### Expressionsvektor pcDNA4 PA83 Kozak

Konstruktbeschreibung: Der Vektor enthält das 83 kDa PA-Gen aus pQE30PA B/S als 2255 bp großes PCR-Fragment (Primerpaar: PAKozak und PArevApaI, Tab. 3), KpnI/ApaI kloniert in pcDNA4 als 3'-Fusion mit dem c-myc Tag. Die „Kozak“-Sequenz wurde speziell eingeführt, um in eukaryontischen Zellen eine optimale Translation zu erzielen.

#### Expressionsplasmid pcDNA4 PA63 Kozak

Konstruktbeschreibung: Der Vektor enthält das PA-Gen aus pQE30PA B/S ohne aminoterminalen 20 kDa Peptid als 1694 bp großes PCR-Fragment (Primerpaar: PA63Kpn und PArevApaI, Tab. 3), kloniert in pcDNA4 als 3'-Fusion mit dem c-myc Tag. Die „Kozak“-Sequenz wurde speziell eingeführt, um in eukaryontischen Zellen eine optimale Translation zu erzielen.

#### **3.21.4 Klonierung in pVAX (Invitrogen)**

Der Vektor pVAX-1 ist ein von Invitrogen speziell für die Entwicklung von DNA-Vakzinen angebotener Vektor, entsprechend den FDA-Guidelines: „Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications“ vom 22.12.1996.

#### Expressionsplasmid pVAX-4ß8

Für die Klonierung in diesen Vektor wurde ein aus 2 komplementären Oligonukleotiden hergestelltes DNA-Fragment verwendet, das ein antigenes Epitop (small loop structure 4ß8) aus der Domäne 4 des protektiven Antigens von *B. anthracis* enthält (Little and Ivins, 1999, Varughese et al., 1999, Petosa et al., 1997), Nukleotide 3925-3969 in der Sequenz von Welkos et al. (1988). Für die Synthese der entsprechenden Oligonukleotide wurde abweichend von der Originalsequenz der humane codon-usage-code verwendet (National Center for Biotechnology Information, NCBI, Bethesda, 23.9.1997). Die Sequenz der Oligonukleotide lautet: 5'-atagctagcatggactcaagaagtacaacgacaagctgccctgtacatctccaaccccaactaagggccata-3' und dessen invers komplementäre Sequenz.

#### Expressionsplasmid pVAX PA83

Konstruktbeschreibung: Der Vektor enthält das PA-Gen als 2209 bp großes PCR-Fragment (Primerpaar: PA83Nhe – PArevApa), NheI – ApaI kloniert aus pQE30PA83 B/S unter der Kontrolle der vektoreigenen eukaryontischen Regulationssignale.

#### Expressionsplasmid pVAX PA63

Konstruktbeschreibung: Der Vektor enthält das PA-Gen als 1699 bp großes PCR-Fragment (Primer: PA63Nhe – PArevApa), NheI – ApaI kloniert aus pQE30PA83 B/S unter der Kontrolle der vektoreigenen eukaryontischen Regulationssignale.

Die Klonierungen aller vorhandenen eukaryontischen Expressionskassetten wurden durch partielle Sequenzierung bestätigt.

#### Expressionsvektor pVAXivcPAd4

Für die Klonierung wurde ein synthetisch hergestelltes DNA-Fragment mit der kodierenden Sequenz für die Domäne 4 des protektiven Antigens benutzt (Little and Ivins, 1999; Varughese et al., 1999; Petosa et al., 1997), Nukleotide 3676-4095, AS 596-735 des maturen Proteins, in der Sequenz von Welkos et al. (1988). Die Synthese der die originale AS-Sequenz kodierenden Codons erfolgte mit einer eukaryontischen Codon-Nutzung (National Center for Biotechnology Information, NCBI, Bethesda, 23.9.1997) und wurde durch die Firma Medigenomix, München, als Insert in einem pCR2.1-TOPO-TA cloning vector bereitgestellt. Im folgenden wurde das Insert als HindIII-PstI-Fragment aus diesem Vektor verwendet (im weiteren als PAd4 bezeichnet). Die DNA-Sequenz der Invarianten Kette aus dem Genom der Maus wurde uns durch die Universität Bonn, Dr. Koch, als Plasmid-Konstrukt zur Verfügung gestellt. Die das MHC Klasse II Targeting-Signal sowie den Transmembran-Anker enthaltende Sequenz wurde aus diesem Vektor als PCR-Fragment (im weiteren als ivc bezeichnet) mit der Primerkombination 5'-AAGCTAGCATGGATGACCAACGCGACCTC-3' und 5'-TATAAGCTTCATGCGAAGGCTCTCCAGTTGC-3' amplifiziert und mit den Restriktasen NheI und HindIII gespalten. Im Anschluß wurden die Fragmente PAd4 und ivc über den HindIII-Ort miteinander ligiert. Das entstandene Fusionsprodukt aus 219 AS kodierenden Nukleotiden wurde als Insert in den zuvor mit NheI und HindIII gespaltenen Vektor pVAX ligiert (im weiteren als pVAXivcPAd4 bezeichnet, s. Abb. 9) und dieser in *E. coli* K12 kloniert. Die Expression des Fusionsproteins wurde nach Transfektion von COS7-Zellen getestet (Abb. 26).

#### **3.21.5 Klonierung des Exosporium-Antigens BclA im Expressionsvektor pQE30**

Für die Klonierung wurden die von Sylvestre et al. (2003) hinterlegten Sequenzen für bclA-Gene miteinander verglichen (Software: Vektor NTI Suite 8) und entsprechende Primer für die translatierte Sequenz designed. Da die internen collagen-like repeat Sequenzen eine hohe Variabilität besitzen, wurden die Gene für zwei in diesem Locus sehr unterschiedliche Stämme, A1 und A49, aus der Stammsammlung des Instituts ausgewählt. Der Stamm A1, der als „Sterne“ in der Sammlung geführt wird, enthält ein bclA-Gen von ca. 1250 bp. Diese Größe stimmt mit der von Sylvestre et al. (2003) hinterlegten Sequenz von 1337 bp für den

Stamm Sterne nicht überein. Der Stamm A49 ist ein aus einem Rind isolierter Wildtyp mit einer bclA-Sequenz von ca. 800 bp. Beide Gene wurden mittels der Primerkombination 5'-GCGGGATCCATGTCAAATAATAATTATTCAAATGG-3' und 5'-GCGGTCGACT-TAAGCAACTTTTTCAATAATAATGG-3' amplifiziert, mit den Restriktasen BamHI und Sall gespalten und in einen entsprechend gespaltenen Vektor pQE30 in *E. coli* K12 kloniert. Diese Klone, pQE30bclA1 und pQE30bclA49, wurden für die Folgeklonierungen sowie für die Herstellung größerer Mengen des rekombinanten Proteins verwendet.

### **3.21.6 Klonierung einer eukaryontischen Expressionskassette mit dem Exosporium-Antigen BclA im Vektor pSecTag2B (Invitrogen)**

Für die Klonierung in den eukaryontischen Vektor wurde das Gen des Stammes A1 verwendet. Da uns zunächst kein BclA-spezifischer mAk zur Verfügung stand, wurde das Gen sowohl als Fusionsprodukt mit den vektoreigenen tags (myc und 6xHis) als auch ohne diese tags kloniert. Die erste Variante diente dem Expressionsnachweis in Zellkulturen mittels myc-spezifischem mAk. In späteren Versuchen konnten BclA-spezifische mAk aus dem Labor von P. Sylvestre (Institut Pasteur, Paris) auch für den Nachweis der Expression des Proteins ohne tag eingesetzt werden.

Die entsprechenden PCR-Produkte wurden aus dem pQE30BclA1 mittels der Primerkombination bclAfor: 5'-GCGAAGCTTTCAAATAATAATTATTCAAATGG-3' und bclArevStop: 5'-ATAGGGCCCTTAAGCAACTTTTTCAATAATAATG-3' bzw. bclAfor und bclArev: 5'-ATAGGGCCCAGCAACTTTTTCAATAATAATG-3' amplifiziert, mit den Restriktasen HindIII und ApaI gespalten und in einen entsprechend gespaltenen Vektor pSecTag2B in *E. coli* K12 kloniert. Die Klone wurden durch Sequenzierung bestätigt und die Expression des BclA in transfizierten COS7-Zellen überprüft (Abb. 33).

### **3.22 Statistische Methoden**

Serumtiter und Zytokinantworten der einzelnen Gruppen wurden mittels Student T-Test untereinander verglichen. Überlebensdaten der Versuchsgruppen aus den Belastungsversuchen wurden mit dem log rank Test unter Einbeziehung der Parameter Überleben und Überlebensdauer paarweise miteinander verglichen. Korrelationen zwischen immunologischen Daten und dem Überleben der einzelnen Mäuse im Infektionsversuch wurden mittels der Spearman's Rank Correlation überprüft. P-Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant erachtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Entwicklung von Mausmodellen zum Nachweis der Immunität gegen eine Infektion mit Lebendsporen von *B. anthracis* nach Immunisierung mit rPA-Vakzinen

Für die Prüfung der immunogenen Eigenschaften von Vakzinekandidaten wurden die dafür international üblichen genetisch einheitlichen Inzuchtlinien von Mäusen verwendet. Dagegen erschienen für die Prüfung der Protektivität von Vakzinen die Daten aus einer nicht immundefekten und mit einer weitgehend natürlichen genetischen Variabilität ausgestatteten Auszuchtpopulation aussagekräftiger. Dafür war ein entsprechendes Modell zu entwickeln. Im folgenden werden die Daten zur Etablierung von Negativkontrollen für das A/J- und NMRI-Mausmodell sowie für die in den Immunisierungsversuchen in NMRI-Mäusen relevante Positiv-Kontrolle dargestellt.

#### 4.1.1 Prüfung eines Belastungsmodells für A/J- und NMRI-Mäuse

##### 4.1.1.1. Ermittlung der mittleren letalen Dosis ( $LD_{50}$ ) von Sporen des Stammes STI für das A/J-Mausmodell

Für den Versuch wurden 5 Versuchsgruppen mit je 10 Tieren (8-10 Wochen alte, weibliche A/J-Mäuse) gebildet. Die Infektion erfolgte mit Sporen aus einer Originalampulle des STI-Impfstoffes, i. p., in 100  $\mu$ l physiologischer Kochsalzlösung mit 0,1 % Gelatine, im Dosisbereich von  $3,5 \times 10^2$  –  $2,3 \times 10^6$  Sporen pro Tier. Abb. 5 zeigt die Sterbekurven der Versuchsgruppen. Die Berechnung der mittleren letalen Dosis erfolgte nach der Methode von Reed-Münch (1938). Danach beträgt die  $LD_{50}$   $1,4 \times 10^4$  Sporen.

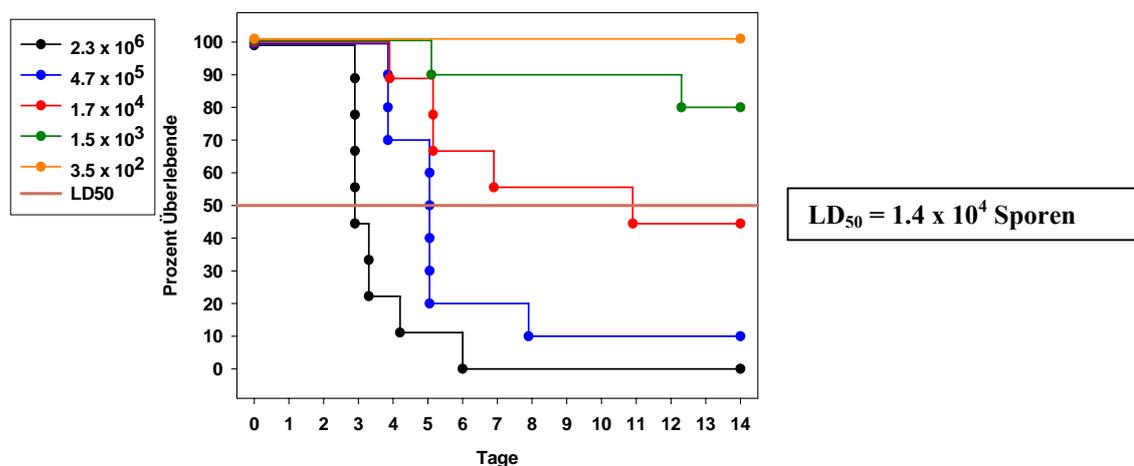


Abb. 5: Bestimmung der  $LD_{50}$  im A/J-Mausmodell mit Sporen des russischen Vakzinestammes STI

#### 4.1.1.2 Ermittlung der LD<sub>50</sub> für das NMRI-Mausmodell

Für den Versuch wurden 5 Versuchsgruppen mit je 10 Tieren (10-12 Wochen alte, weibliche NMRI-Mäuse) gebildet. Die Infektion erfolgte mit Ames Sporen, s. c., in 100-300 µl physiologischer Kochsalzlösung mit 0,1 % Gelatine im Dosisbereich von  $3 \times 10^0 - 5,9 \times 10^2$ . Die Berechnung der mittleren letalen Dosis wurde nach der Methode von Reed und Muench (1938) vorgenommen. Danach beträgt die LD<sub>50</sub> 38 Sporen. Abb. 6 zeigt die Sterbekurven der Versuchsgruppen.

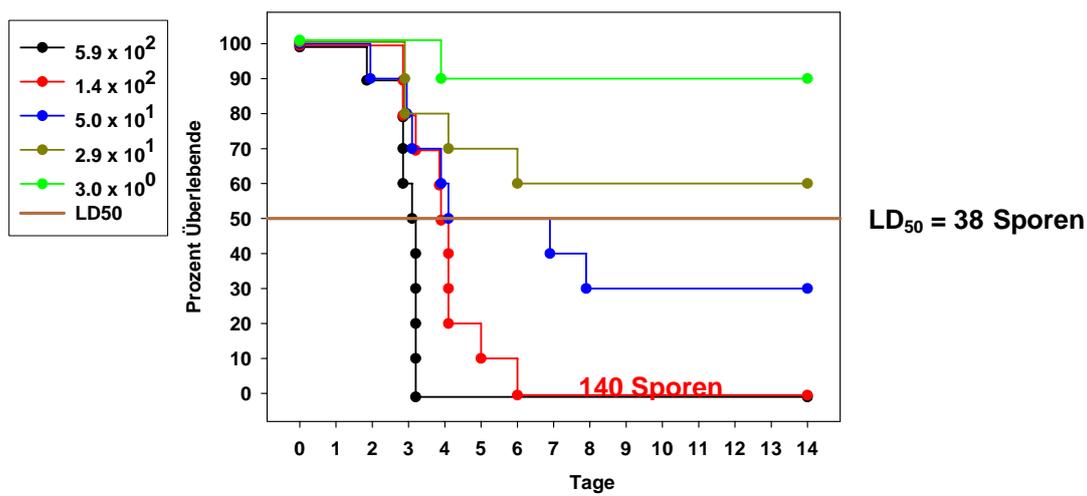


Abb. 6: Bestimmung der LD<sub>50</sub> im NMRI-Mausmodell mit Sporen des Stammes Ames

#### 4.1.1.3 Challenge von nicht immunisierten A/J-Mäusen mit Lebendsporen

Für die Definition einer Negativ-Kontrolle mit 100 % Todesrate im A/J-Mausmodell wurden unbehandelte Tiere (weiblich, 6-8 Wochen alt) mit  $2,8 \times 10^5$  Sporen vom Stamm STI, i. p. oder mit  $3,7 \times 10^5$  Sporen vom Stamm Sterne (Eigenherstellung), i. p. oder s. c. infiziert. Alle Tiere der 3 Gruppen verstarben innerhalb von 2-5 Tagen (Abb. 7). In einer Versuchsgruppe, die nur  $6,3 \times 10^4$  Sporen vom Stamm STI, i. p., erhalten hatte, verstarben in Übereinstimmung mit den ermittelten LD<sub>50</sub>-Werten nur 60 % der Tiere. Die Unterschiede in den Überlebenszeiten zwischen den Gruppen mit 100 % Todesraten waren nicht signifikant.

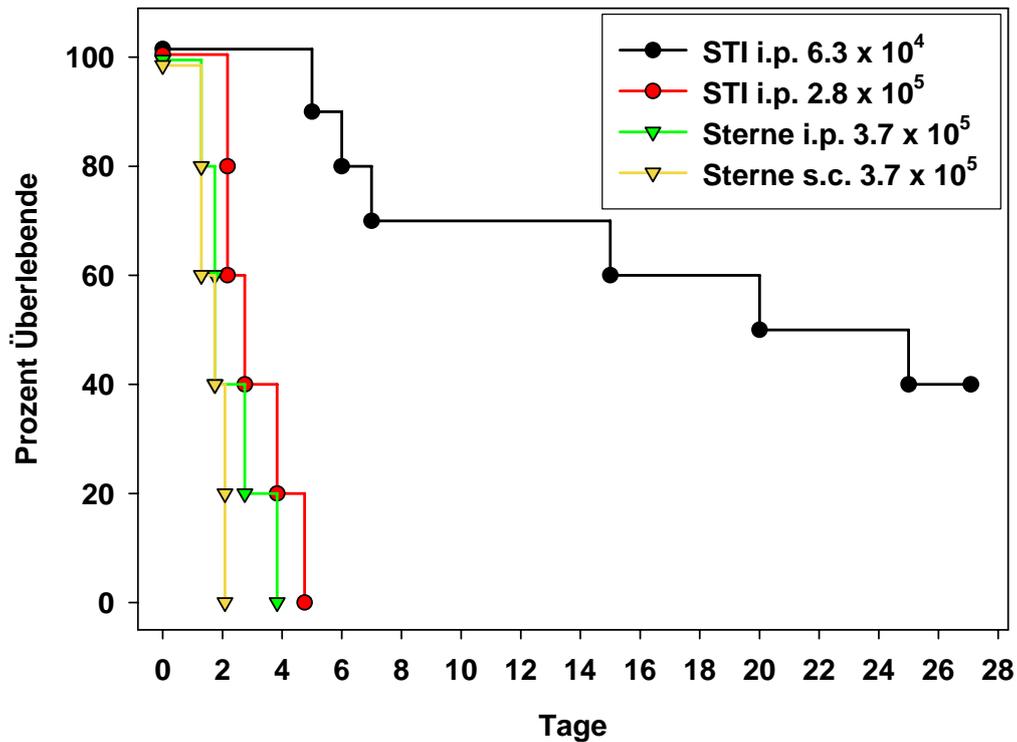


Abb. 7: Überlebensraten von nicht immunisierten A/J-Mäusen nach Belastungsinfektion mit Lebendsporen der Stämme STI oder Ames

#### 4.1.1.4 Belastung von nicht immunisierten Balb/c-Mäusen mit Letaltoxin

Für Versuche mit rekombinanten Salmonellen sind Balb/c-Mäuse auf Grund ihrer Genetik die am häufigsten verwendete Versuchstiere. Sie sind jedoch unempfindlich gegenüber einer Infektion mit Lebendsporen der Vakzinestämme STI oder Sterne. Daher wurde alternativ geprüft, ob als Belastungs-Modell eine von Price et al. (2001) beschriebene Methode zur Belastung mit gereinigtem rekombinanten Letaltoxin geeignet ist. Bei Verwendung der von diesen Autoren publizierten Kombination von 60 µg rPA83 und 25-30 µg rLF für naive Balb/c-Mäuse wurde kein Tier getötet. Die Dosis wurde daher auf 100 µg rPA83 und 50 µg rLF erhöht. Danach starben 3 von 5 getesteten naiven Tieren nach 2 (1 Maus) und 4 (2 Mäuse) Tagen. In einem Folgeversuch nach Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen wurde die Dosis auf je 100 µg PA83 und LF erhöht, bei der erstmalig alle Kontrollmäuse verstarben. Aufgrund der extremen Kosten, die ein Challenge größerer Tierzahlen damit verursachen würde sowie der Schwierigkeiten, die eine verlässliche Applikation des Toxins in die Schwanzvene verursachte, wurde dieses Challenge-Modell nicht weiter verfolgt.

#### 4.1.2. Evaluierung einer Positiv-Kontrolle für das NMRI-Mausmodell

Vorversuche in A/J-Mäusen hatten nach 3facher Immunisierung mit nur 2,5 µg rPA und RIBI-Adjuvans und einer Booster-Immunisierung mit  $6,4 \times 10^4$  Sporen vom Stamm STI, i. p., einen vollständigen Schutz gegen eine i. p. Infektion mit  $2,5 \times 10^5$  STI-Sporen bewirkt (Daten hier nicht gezeigt), einer Dosis, bei der die entsprechende Negativkontrolle nach 5 Tagen verstorben war (Abb. 7). Dieses Immunisierungsschema wurde auf das Auszuchtmausmodell übertragen. Für die Etablierung einer Positiv-Kontrolle wurden weibliche NMRI-Mäuse zweimal im Abstand von 2 Wochen mit 25 µg rPA83 und entweder RIBI-Trimix oder Lipopeptid als Adjuvans, s. c., immunisiert. Zwei Wochen später erhielten die mit RIBI-Trimix immunisierten Tiere  $9,6 \times 10^6$  Sporen des Stammes STI und die mit Lipopeptid immunisierten Mäuse  $1,6 \times 10^6$  Sporen des Stammes Sterne, s. c., gespritzt. Vier Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Gruppen mit  $9,3 \times 10^2$  Ames Sporen ( $25 \times LD_{50}$ ), s. c., infiziert. Die Belastungsinfektion erfolgte mit einer Sporensuspension in physiologischer Kochsalzlösung mit 0,1 % Gelatine. Abb. 8 zeigt den Vergleich der Ak-Endtiter beider Versuchsgruppen unmittelbar vor der Infektion. Die Titer unterscheiden sich neben den Anteilen der IgG-Subklassen vor allem in der Höhe der sporenspezifischen antiBclA-Antikörpertiter. Während in der RIBI/STI immunisierten Gruppe nur 60 % der Tiere den Challenge überlebten, waren es in der LP/Sterne Gruppe 100 %.

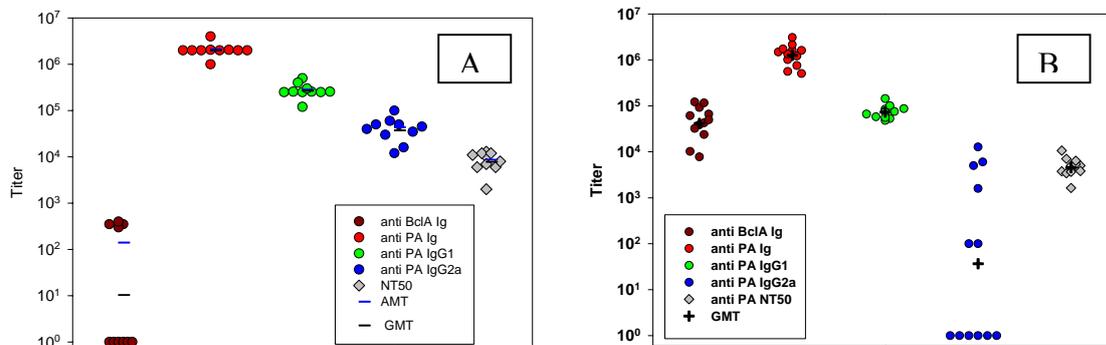


Abb. 8: Etablierung einer Positivkontrolle zur Immunisierung von NMRI-Mäusen mit rPA-Vakzinen

A: Immunisierung mit 2 x 25 µg rPA83 + RIBI, 14 Tage Abstand, danach  $9,6 \times 10^5$  Sporen STI, s. c.

B: Immunisierung mit 2 x 25 µg rPA83 + LP, 14 Tage Abstand, danach  $1,6 \times 10^6$  Sporen Sterne, s. c.

## 4.2 Immunantworten und Schutzraten im Maus- und Kaninchenmodell nach Immunisierung mit rekombinantem PA und verschiedenen Adjuvantien

### 4.2.1 Vergleich der Immunisierung von Balb/c und A/J Mäusen mit rekombinantem PA und RIBI-Adjuvans

Je 10 Balb/c- und A/J-Mäuse (weiblich, 6-8 Wochen alt) wurden 3 Mal im Abstand von 14 Tagen mit 2,5 µg rPA83 und RIBI-Adjuvans immunisiert. Die rPA-Dosis entsprach dabei der in 1 Vakzineeinheit AVA für den Menschen enthaltenen Menge. Die 1. Dosis wurde i. m., alle weiteren Dosen s. c. verabreicht.

Von beiden Tiergruppen wurden 12 Tage nach der letzten Immunisierung Blut entnommen. Die Werte für antiPA gesamt Ig, IgG1 und IgG2a sowie für die 50 %igen Neutralisationstiter (NT<sub>50</sub>) zeigt die Abb. 9. A/J-Mäuse reagierten danach bei gleicher Immunisierung mit 10fach höheren antiPA gesamt Ig-Titern und NT<sub>50</sub> als Balb/c-Mäuse.

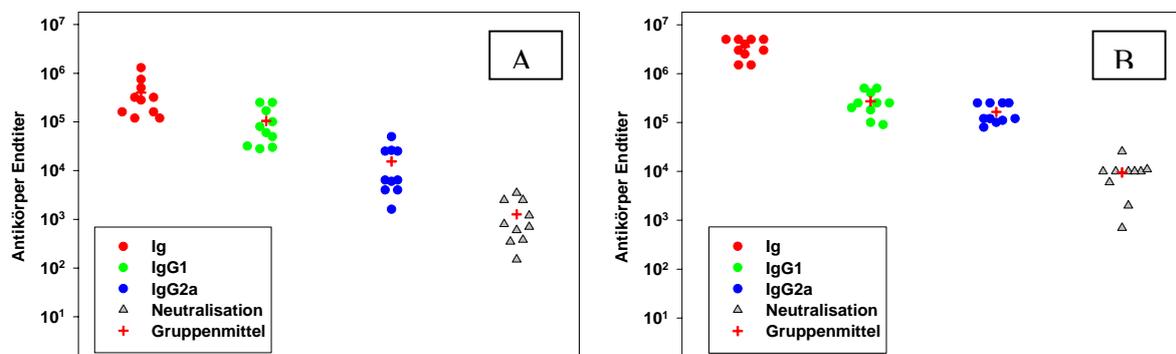


Abb. 9: Anti-PA ELISA Titer und NT<sub>50</sub> von (A) Balb/c-Mäusen und (B) A/J Mäusen nach Immunisierung mit rekombinantem PA83 und RIBI-Adjuvans

### 4.2.2 Optimierung der Vakzinierung mit dem rekombinanten PA83 aus *E. coli* und verschiedenen Adjuvantien im NMRI-Mausmodell

Literaturdaten belegen die Protektivität einer mit rekombinantem PA parenteral induzierten Immunantwort in verschiedenen Tiermodellen. Die Immunogenität des Antigens war dabei abhängig von den eingesetzten Adjuvantien (Ivins et al., 1990, 1992, 1995). In Vorversuchen hatte sich die 3fache Immunisierung mit 2,5 µg rPA und RIBI-Adjuvans im A/J-Modell als protektiv erwiesen. Das in Tierversuchen sehr potente Adjuvans RIBI-Trimix ist jedoch für die Anwendung am Menschen nicht zugelassen. In den im folgenden ausgewerteten Versuchen wurde daher ein von der Firma EMC Microcollections GmbH, Tübingen zu beziehendes Lipopeptid-Adjuvans eingesetzt, dessen Adjuvanswirkung bereits in anderem

Zusammenhang belegt worden war. Es sollte geprüft werden, ob damit eine gegenüber Alhydrogel als Adjuvans verbesserte Stimulation der Immunantwort auf rPA im Maus- und Kaninchen-Modell zu erzielen ist. Das verwendete synthetische Lipopeptid basiert auf dem N-terminalen Anteil bakterieller Lipopeptide, enthält aber nur Palmitinsäure. Die Adjuvanswirkung dieser Moleküle wird zusätzlich verstärkt durch die Kopplung eines spezifischen T-Helferzellepitops. In den hier beschriebenen Versuchen wurde das mausspezifische Epitop (FISEAIIHVLHSRHPG) verwendet (Abb. 10).

Für die folgenden Versuche wurde das Adjuvans durch Herrn Prof. Bessler, Univ. Freiburg, zur Verfügung gestellt.

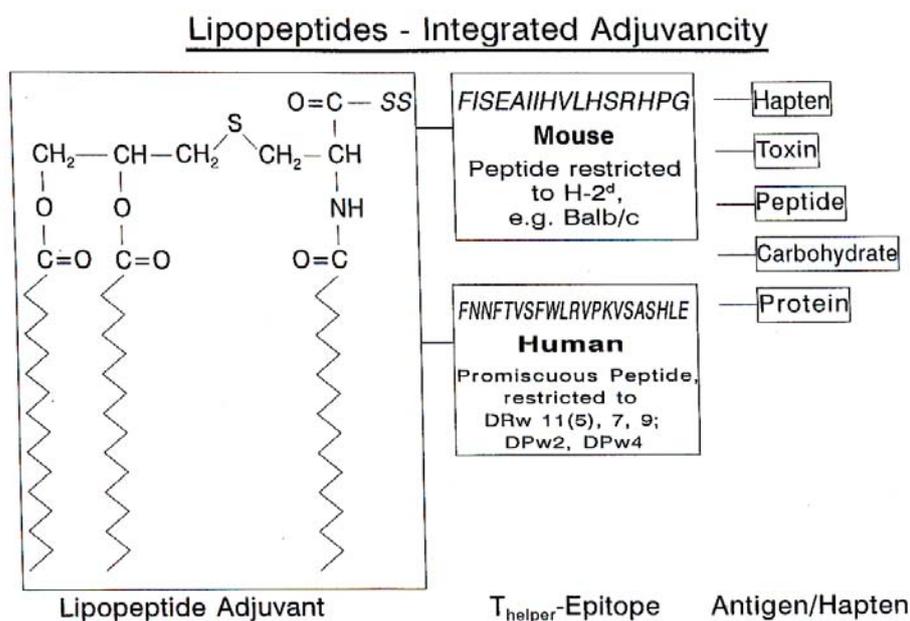


Fig. 5: Molecular model for the development of novel synthetic immunogens and vaccines.

Abb. 10: Modell des Lipopeptid-Adjuvans, entnommen aus Bessler et al. (1997), Behring Institute, Mittlg., 98, 390-399.

Je 20 weibliche NMRI Mäuse, 8-10 Wochen, wurden mit rPA83 und dem Lipopeptid (Gruppe LP rPA), rPA und einer Mischung aus Lipopeptid und Alhydrogel (Gruppe Ah/LP rPA) bzw. nur der Adjuvansmischung als Negativkontrolle (Gruppe Ah/LP) dreimal im Abstand von 14 Tagen s. c. immunisiert. Die Impfdosis betrug je 200 µl in der unter Punkt 3.11.4 aufgeführten Zusammensetzung.

Die Belastungsinfektion erfolgte 30 Tage nach der letzten Immunisierung mit 290 Sporen vom Stamm Ames (7,6 x LD<sub>50</sub>), s. c., in 200 µl physiologischer Kochsalzlösung mit 0,1 % Gelatine. Die Antikörpertiter wurden 5 Tage vor und von überlebenden Tieren, 14 Tage nach der Belastungsinfektion (nicht gezeigt), bestimmt.

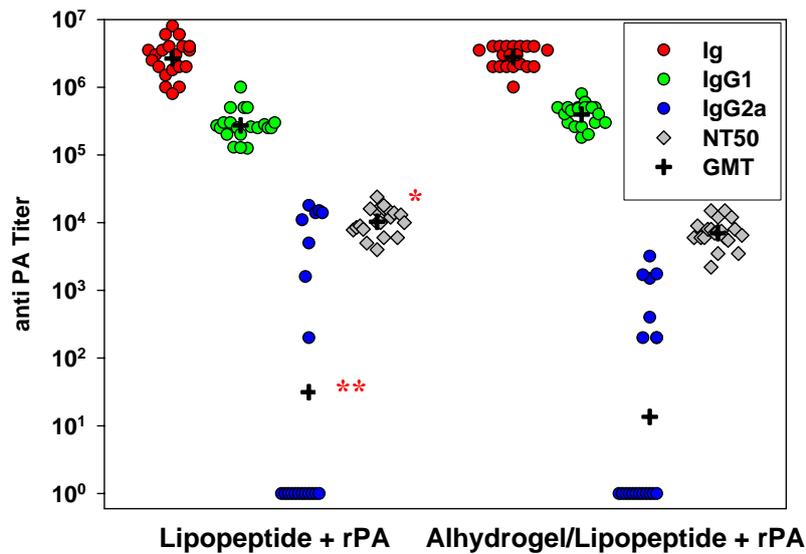


Abb. 11: Titer für NMRI-Mäuse nach Immunisierung mit rPA83 und Lipopeptid-Adjuvans im Vergleich zur Ah/LP-Adjuvansmischung, vor der Belastungsinfektion

\* p = 0,0103, Student t-test

\*\*p = 0,0209, Student t-test

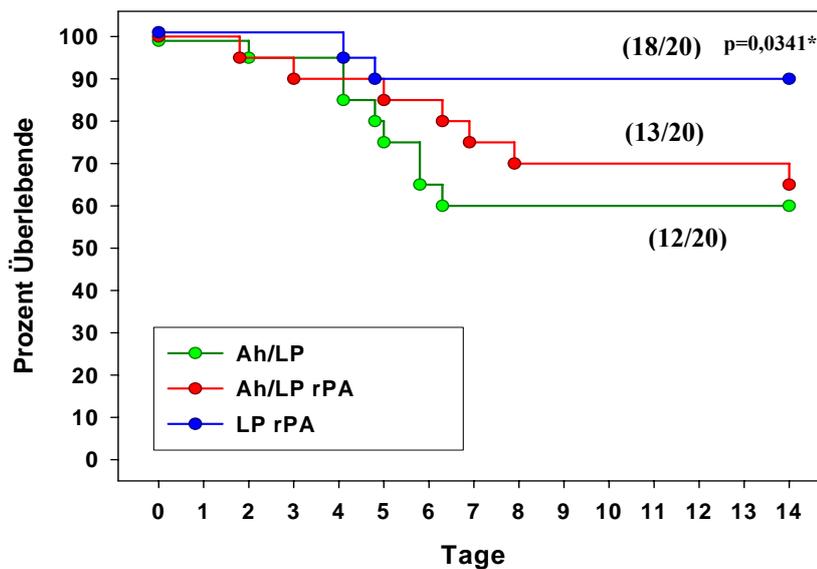


Abb. 12: Überlebensraten von NMRI-Mäusen nach Immunisierung mit rPA83 und Lipopeptid-Adjuvans im Vergleich zur Ah/LP-Adjuvansmischung, Challenge s. c., mit 290 Sporen des Stammes Ames

\* log rank test, Vergleich zur Negativkontrolle

Die Versuchsgruppen reagierten sehr homogen und mit einem signifikant höheren antiPA IgG2a Titer und NT<sub>50</sub> in der Versuchsgruppe nach rPA und LP Impfung (Abb. 11). Diese Tiere überlebten den Challenge mit 290 Ames-Sporen zu 90 %, gegenüber 65 % in der

Ah/LP rPA Gruppe. Tiere, die mit der Adjuvansmischung ohne Antigen behandelt waren, überlebten zu 60 % (Abb. 12), während bei der Bestimmung der LD<sub>50</sub> in naiven Tieren bereits bei einer Dosis von 140 Sporen alle Tiere verstorben waren (Abb. 6). Die Überlebensrate der mit Lipopeptid und rPA immunisierten Gruppe war signifikant höher als die der Negativgruppe, nicht aber jene der mit Ah/LP und rPA immunisierten Versuchsgruppe. Aufgrund der unerwarteten Überlebensrate nur mit Adjuvans behandelter Tiere wurde der Versuch unter Erweiterung der Versuchsgruppen und der auszuwertenden immunologischen Parameter in folgender Weise wiederholt.

Je 12 weibliche NMRI-Mäuse (8-10 Wochen alt) wurden in die folgenden Gruppen eingeteilt:

Gruppe NN: Naive Negativkontrolle

Gruppe NA: Negativkontrolle für Ah als Adjuvans

Gruppe NL: Negativkontrolle für LP als Adjuvans

Gruppe Ah: Versuchsgruppe mit 25 µg rPA83 und Alhydrogel/Dosis

Gruppe LP: Versuchsgruppe mit 25 µg rPA83 und Lipopeptid/Dosis

Gruppe P: Positivkontrolle, 2 x rPA83 + LP, 1 x 1.6 x 10<sup>6</sup> Sporen vom Stamm Sterne

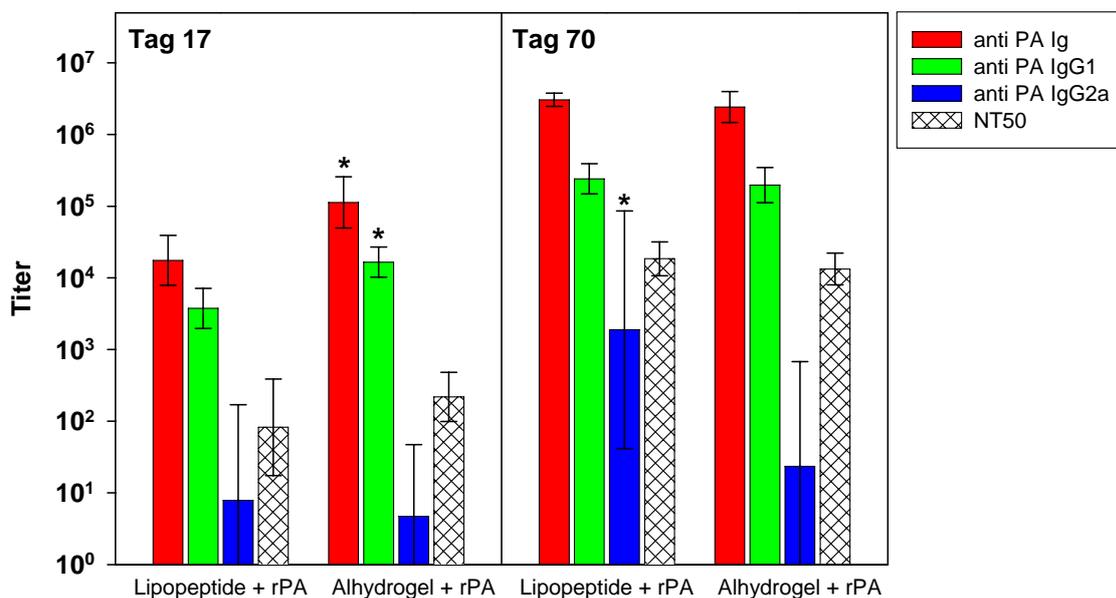


Abb. 13: AntiPA-ELISA Titer und NT<sub>50</sub> für NMRI-Mäuse nach Immunisierung mit rPA83 und Alhydrogel oder Lipopeptid als Adjuvans

Alle Mäuse erhielten 3 Immunisierungen mit einem Abstand von 18 Tagen zwischen 1. und 2. sowie 28 Tagen zur 3. Immunisierung. Die Impfdosen wurden in 200 µl Volumen, s. c., in der unter Punkt 3.16.4 angegebenen Zusammensetzung appliziert.

Die Bestimmung der antiPA Titer sowie der neutralisierenden Aktivität erfolgte vor der 2. und nach der 3. Immunisierung.

Abb. 13 zeigt die Entwicklung der Titer nach 1. (Tag 17) und 3. (Tag 70) Impfung. Während nach der 1. Impfung noch signifikante Unterschiede der antiPA gesamt Ig sowie der IgG1-Titer zwischen den beiden Adjuvansgruppen gemessen wurden, waren diese nach der 3. Immunisierung egalisiert. Der Anteil an IgG2a antiPA-Ak ist jedoch nach der 3. Immunisierung mit rPA und Lipopeptid signifikant höher als nach Impfung mit rPA und Alhydrogel.

Für je 2 Tiere aus jeder Gruppe wurden zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion Milzzellkulturen angelegt, um die Zytokinkonzentrationen, IL-4, IL-5 und  $IFN\gamma$ , im Zellkulturüberstand zu bestimmen. Alle Zytokinmessungen erfolgten nach 62 h Inkubation, mit bzw. ohne Antigenstimulation mit rPA83. Abb. 14 enthält die entsprechenden Meßwerte. Die Immunisierung mit rPA und Alhydrogel als Adjuvans ergab höhere IL-4 Werte und deutlich höhere IL-5 Werte als die Impfung mit rPA und Lipopeptid.

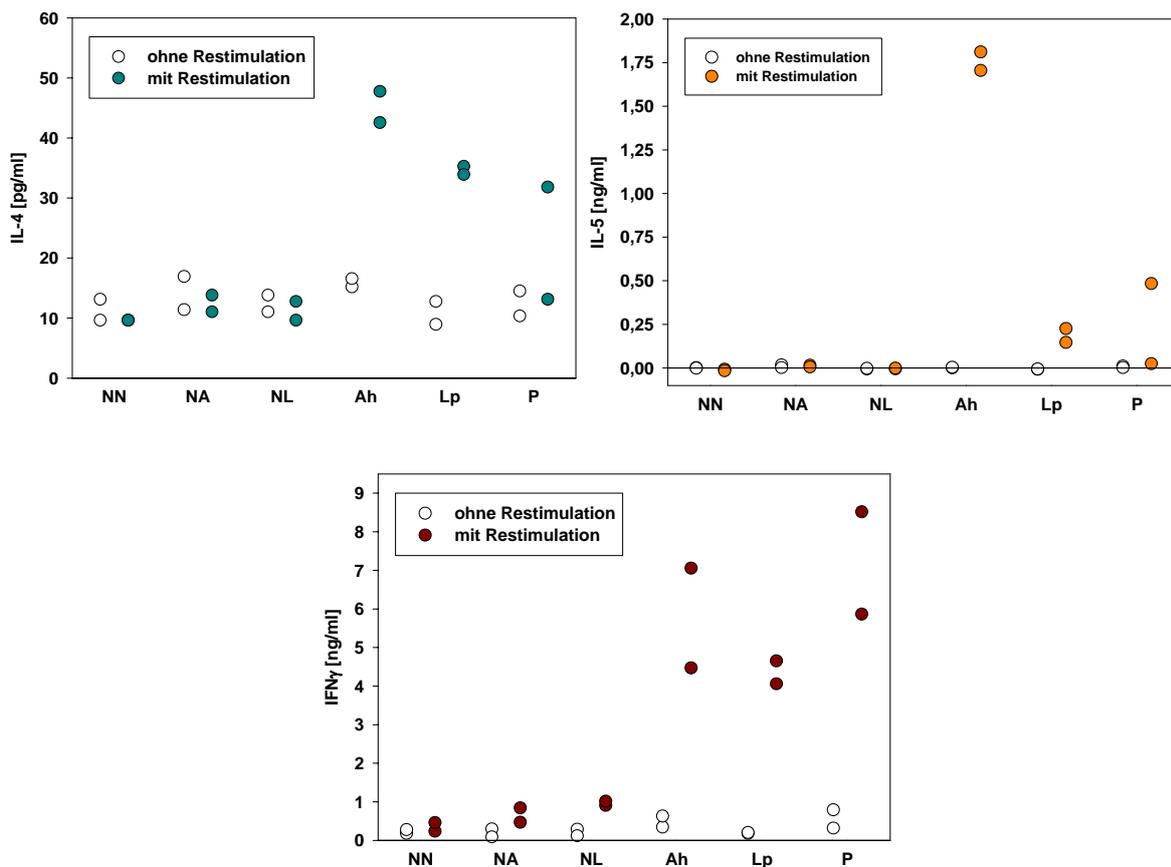


Abb. 14: Zytokinwerte für NMRI-Mäuse nach Immunisierung mit rPA83 und Alhydrogel oder Lipopeptid als Adjuvans



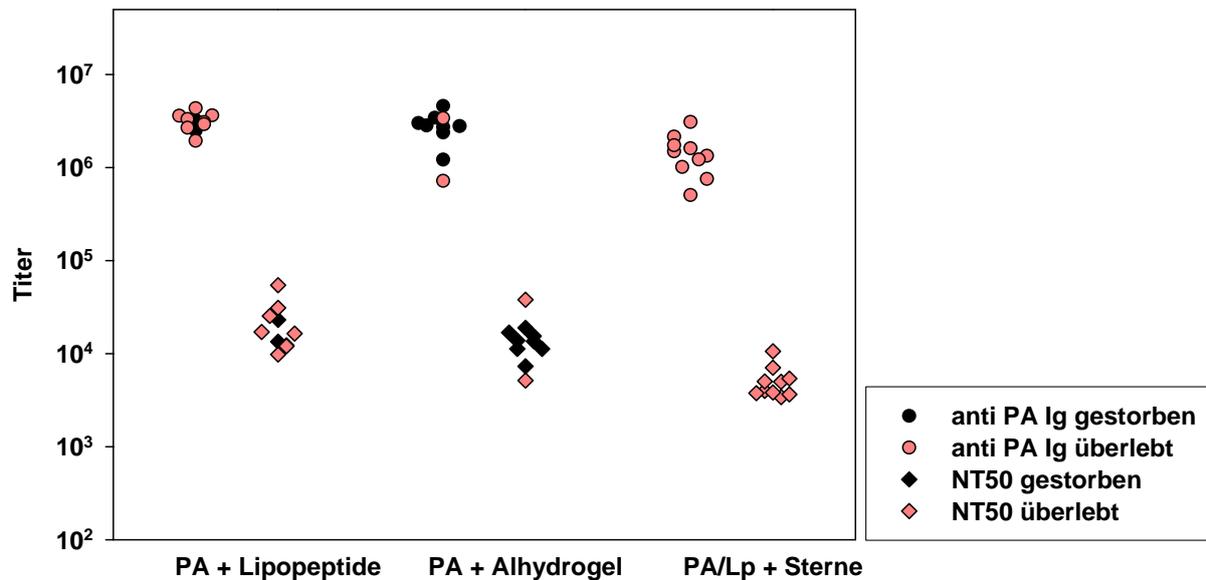


Abb. 16: Korrelation in NMRI-Mäusen zwischen antiPA ELISA-Titern, NT<sub>50</sub> und dem Überleben nach Infektion mit der 21fachen LD<sub>50</sub> Sporen vom Stamm Ames

#### 4.2.3 Vergleichende Vakzinierung von Kaninchen mit AVA und rPA/Lipopeptid

In publizierten Studien wurde gezeigt, daß eine dem Menschen vergleichbare Immunität gegen eine subkutane oder aerogene Infektion mit *B. anthracis* im Kaninchen zu erzeugen ist (Zaucha et al., 2001). Neben Versuchen an nichthumanen Primaten steht zur Zeit als Alternative zu kleinen Nagern nur das Kaninchen-Modell zur Verfügung (Ivins et al., 1998; Pitt et al., 1996a, b, 1999; Fellows et al., 2001). Das Versuchsprogramm enthielt daher orientierende Versuche zur Immunisierung von Kaninchen mit rPA83 und dem Lipopeptid-Adjuvans im Vergleich zur Humanvakzine AVA sowie einer auf dem rPA83 aus *E. coli* in Verbindung mit Alhydrogel basierenden Vakzine.

In 2 aufeinanderfolgenden Versuchen wurden je 3 Kaninchen (NZW, weiblich, 1,5 bis 2 kg bei Versuchsbeginn) mit rPA83 und dem Lipopeptid (Gruppe LP/rPA) bzw. je 3 Kaninchen nur mit dem Adjuvans (Gruppe LP) zweimal im Abstand von 28 Tagen, s. c., zwischen die Schulterblätter immunisiert. Zusätzlich wurden 3 Kaninchen mit der amerikanischen Humanvakzine AVA (Gruppe AVA) sowie 3 Kaninchen mit der Kombination rPA83 + Alhydrogel auf gleiche Weise geimpft. Die Impfdosis betrug je 500 µl in der nachfolgend aufgeführten Zusammensetzung:

Gruppe LP:	500 µg Lipopeptid in 500 µl EF-PBS
Gruppe LP/rPA:	500 µg Lipopeptid in 500 µl EF-PBS + 25 µg rPA83
Gruppe AVA:	500 µl AVA (Ablaufdatum 28.07.1998, Lot FAV016)
Gruppe Ah/rPA:	15 % Alhydrogel in 500 µl EF-PBS + 25 µg rPA83

Die Antikörperwerte wurden vor jeder Immunisierung sowie vor der Belastung (Abb. 17) und von überlebenden Tieren 14 Tage nach der Belastungsinfektion (Daten nicht gezeigt) bestimmt.

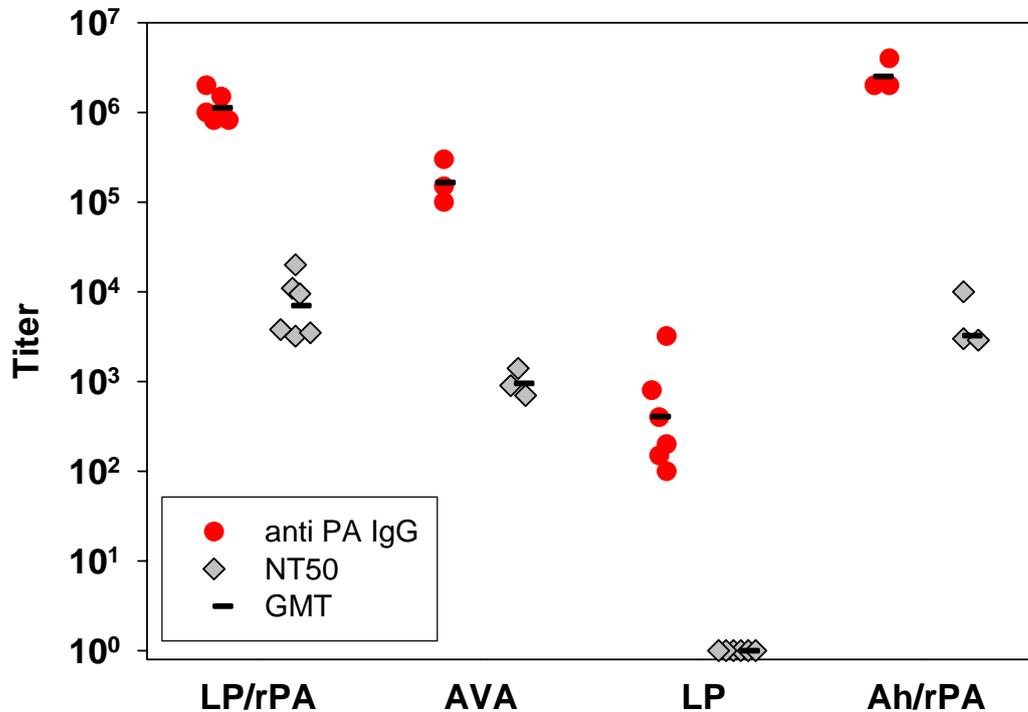


Abb. 17: AntiPA ELISA- und Neutralisationstiter von Kaninchen vor der Belastungsinfektion, nach 2 Immunisierungen mit einer Proteinvakzine und verschiedenen Adjuvantien

Die Titerwerte ergeben sich als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe ( $2^n$ ) mit einer  $OD_{414nm} \geq 0,1$ .

Die Belastungsinfektion wurde aus versuchstechnischen Gründen für je 3 Tiere der Negativkontrolle (LP) 21 bzw. 28 Tage, für je 3 Tiere der Gruppe LP/rPA 28 bzw. 38 Tage, für die Gruppe Ah/rPA 28 Tage und für die Gruppe AVA 50 Tage nach der letzten Immunisierung vorgenommen. Dabei wurden zunächst 3 Tiere der als Negativkontrolle verwendeten Gruppe LP (Adjuvans ohne Antigen) mit  $2 \times 10^5$  Sporen des Stammes Ames ( $100 \times LD_{50}$ ), appliziert in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung mit 0,1 % Gelatine, s. c. infiziert. Diese Dosis für die subkutane Infektion wurde der Literatur entnommen, führte jedoch nur bei einem von drei Tieren zum Tod. Um den Einfluß einer möglichen unspezifischen Immunreaktion nach Adjuvansgabe in der Gruppe LP auszuschließen, wurde der Challenge mit der gleichen Infektionsdosis mit einer Gruppe von 3 naiven Tieren wiederholt. Auch in diesem Fall verstarb nur 1 von 3 Tieren. Eine weitere Tiergruppe, die als Negativgruppe in einem DNA-Vakzineversuch stand, wurde aufgrund dieser Ergebnisse mit

2,5 x 10<sup>6</sup> Sporen des Ames-Stammes infiziert. Diese Tiere starben innerhalb von 4 Tagen (Abb. 18).

Die 3 Versuchsgruppen, rPA + Lipopeptid, AVA sowie Ah/rPA wurden daraufhin mit 2 x 10<sup>6</sup> Sporen (2000 x LD<sub>50</sub>) belastet. Alle Tiere der 3 Versuchsgruppen überlebten.

Die verbliebenen 3 Tiere der nur mit LP behandelten Negativkontrollgruppe (LP) erhielten ebenfalls die hohe Sporendosis als Belastungsinfektion. In dieser Gruppe verstarben 2 von 3 Tieren.

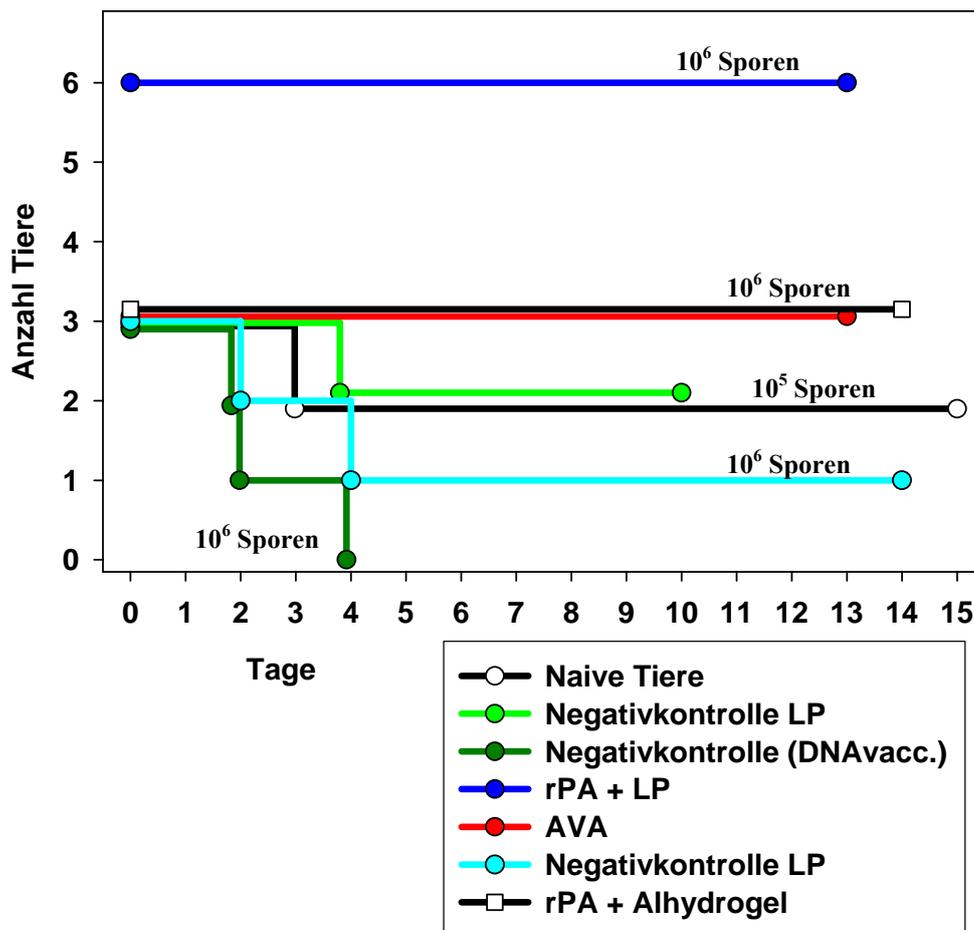


Abb. 18: Challenge von Kaninchen mit Sporen vom Stamm Ames nach Immunisierung mit rPA83 und LP oder AVA im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne Antigengabe

### **4.3 Immunantworten und Schutzraten im Maus- und Kaninchenmodell nach Immunisierung mit rekombinanten DNA-Vakzinen**

#### **4.3.1 Vergleichende DNA-Immunisierung, intramuskulär und mit der Gen Gun, im Balb/c-Mausmodell**

Die Versuche zur Immunisierung von Mäusen mit eukaryontischen Expressionskassetten in Form von gereinigter Plasmid-DNA wurden mit der in der Literatur beschriebenen Methodik für die intramuskuläre Injektion der DNA-Lösungen begonnen. Für spätere Versuche stand die Gen Gun (GG), ein Gerät zur intra- oder subkutanen Applikation von mit DNA beschichteten Goldpartikeln mit Hilfe einer Helium-Druckpistole zur Verfügung. Letztere Applikationsart ermöglicht eine weitaus effektivere Induktion von sowohl Th1 als auch Th2 basierten Immunantworten als bei der i. m. Injektion, bei 250-500fach niedrigeren DNA-Dosen.

In den folgenden Abschnitten werden die mit beiden Methoden erzielten Immunantworten verglichen.

#### Immunisierung intramuskulär

Balb/c-Mäuse (weiblich, 6-8 Wochen alt) erhielten 2 x 50 µg Plasmid-DNA in 2 x 50 µl PBS, i. m., in die *Mm. tibialis anterior* beider Hinterläufe. Einer negativen Kontrollgruppe wurden 2 x 50 µl PBS ohne DNA injiziert. Als positive Kontrollgruppe wurden Mäuse mit 400 µl der humanen Adsorbatvakzine AVA, s. c., immunisiert. Die Impfung erfolgte 3x im Abstand von 14 Tagen. Die folgenden im Kap. 3.20 beschriebenen Expressionskassetten wurden verwendet:

Gruppe A	pCMV\ER PA63
Gruppe B	pCMV\ER PA83
Gruppe C	pSecTag 4β8
Gruppe D	pcDNA4 PA83
Gruppe E	pcDNA4 PA63
Gruppe F	pVAX 4β8
Gruppe G	pSecTag PA83
Gruppe H	pVAX PA83
Gruppe J	pVAX PA63

#### Immunisierung mit der "Gen Gun"

Balb/c-Mäuse (weiblich, 6-8 Wochen alt) wurden 3x im Abstand von 14 Tagen mit auf Goldpartikel präzipitierter Plasmid-DNA immunisiert, wie unter Kapitel 3.10.3 beschrieben.

Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden Serumproben sowie Milzzellen für immunologische Untersuchungen gewonnen.

Aufgrund der Ergebnisse aus den Versuchen zur i. m. Immunisierung wurden die folgenden Expressionskassetten verwendet:

Gruppe A	pCMV\ER PA63
Gruppe B	pCMV\ER PA83
Gruppe F	pVAX4ß8
Gruppe G	pSecTag PA83
Gruppe H	pVAX PA83
Gruppe J	pVAX PA63

Als negative Kontrollgruppe wurden 5 Mäuse mit dem Plasmid pCMV/ERmyc ohne PA-Gen immunisiert.

### Ergebnisse

Die Ergebnisse der Antikörper- und Zytokinmessungen zeigten sowohl eine unterschiedliche Immunogenität der verwendeten Konstrukte, als auch deutliche Unterschiede nach i. m. oder GG Immunisierung für in beiden Anwendungen verwendete Vakzinekandidaten. Nachdem das Peptid 4ß8 im Vektor pSecTag sowie die auf dem Vektor pcDNA4 basierenden Konstruktionen nach i. m. Immunisierung weder meßbare Ak-Titer noch Zytokinwerte induziert hatten, wurden diese Kandidaten für Folgeversuche nicht weiter verwendet. Bei insgesamt niedrigen gesamt Ig Titern gegen rPA83 (Abb. 19) nach i. m. Immunisierung wurden die höchsten Werte für die Plasmide pCMV/ER PA83, pSecTag PA83 und pVAX PA63 gemessen. Nach GG Immunisierung stieg der gesamt Ig-Titer für pCMV/ER PA83 um ca. das 20fache und jener für pSecTag PA83 um das 3-4fache an (Abb. 20 A/B). Verbunden damit war ein Anstieg in der Bildung von IL-4 und IL-5 für diese beiden Konstruktionen (Abb. 21 und 22).

Die Immunisierung mit auf dem Vektor pVAX basierenden Konstruktionen führte nach GG Immunisierung zu einer nur sehr schwachen antiPA Ak-Bildung (Abb. 20), sowie zu keiner (pVaxPA83) bzw. nur sehr geringer (pVAX PA63) Bildung von IL-4 und IL-5 (Abb. 22). Beide Plasmide hatten nach i. m. Immunisierung positive gesamt Ig-Titer induziert, wobei der mittlere Titer der Gruppe pVAX PA63 der höchste aller Gruppen war (Abb. 19). Der das Peptid 4ß8 kodierende Vektor induzierte in beiden Versuchsanstellungen kaum meßbare Immunantworten.

Die das physiologisch aktive Protein PA63 kodierende Konstruktion im Vektor pCMV/myc/ER induzierte in beiden Versuchen schwächere Immunantworten als die entsprechende Konstruktion mit dem PA83-Gen.

Die ELISA-Titer der IgG-Subklassen in Verbindung mit den Werten für die Bildung von IL-4 und IL-5 demonstrieren eine Verschiebung der Immunantwort von Th1 nach i. m.

Immunisierung hin zu einer Th2 dominierten Antwort nach GG Immunisierung. Besonders deutlich wird dies anhand der durch Th2-Zytokine dominierten Immunantwort in den Gruppen A, B und G nach GG Immunisierung (Abb. 21 und 22).

Die Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit der Aluminiumhydroxyd enthaltenden Humanvakzine AVA induzierte erwartungsgemäß eine Th2 basierte Immunantwort mit antiPA gesamt Ig-Titern von > 300.000 sowie hohen (> 50.000) IgG1- und sehr geringen IgG2a-Titern (Daten nicht gezeigt). Die IL-4 und IL-5 Werte waren für diese Gruppe am höchsten (Abb. 21).

Für die Auswahl der erfolgversprechendsten DNA-Vakzinekandidaten wurde sowohl die Induktion von Antikörpern als auch die Bildung von Zytokinen herangezogen und die Anzahl der Reagenten in jeder Versuchsgruppe bestimmt. Die zusammengefaßten Daten sind aus den Tabellen 4 und 5 ersichtlich.

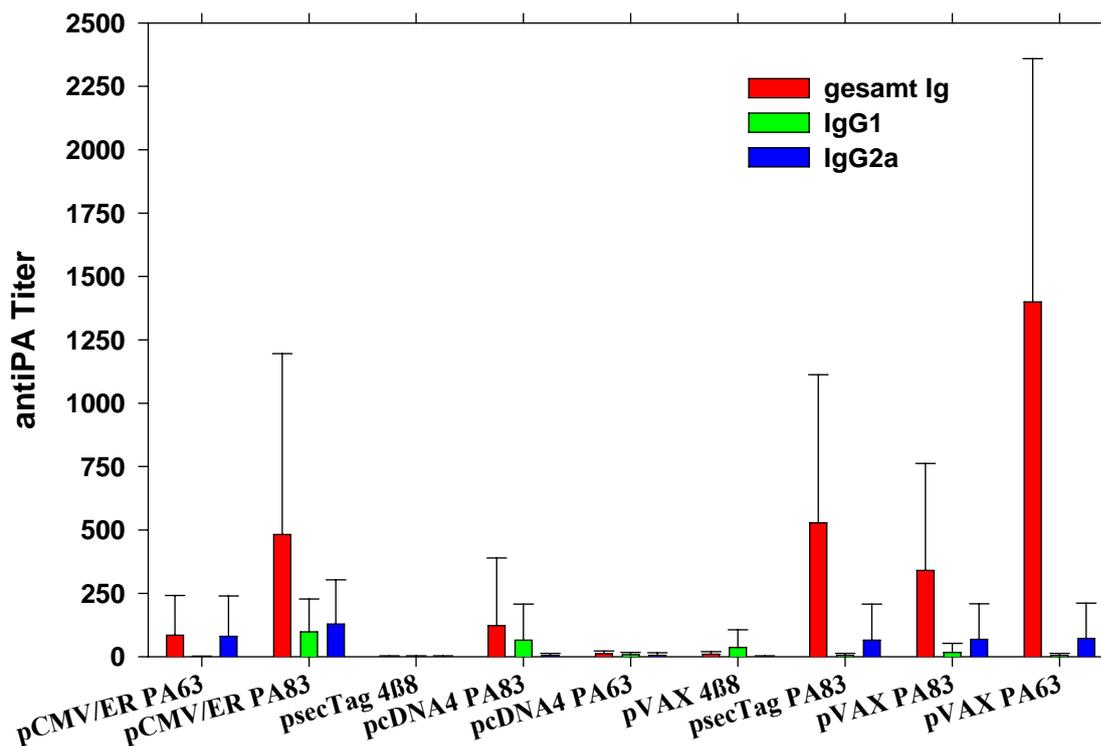


Abb. 19: AntiPA-Endpunkttiter nach i. m. DNA-Immunsierung von Balb/c-Mäusen  
Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Meßwerte für gesamt Ig sowie die IgG-Subklassen 1 und 2a.

Die Endtiter der Einzeltiere ergeben sich als reziproker Wert der höchsten Verdünnungsstufe ( $2^n$ ), deren Meßwert gerade noch größer als der Mittelwert plus 2 x SD der Negativkontrollgruppe war.

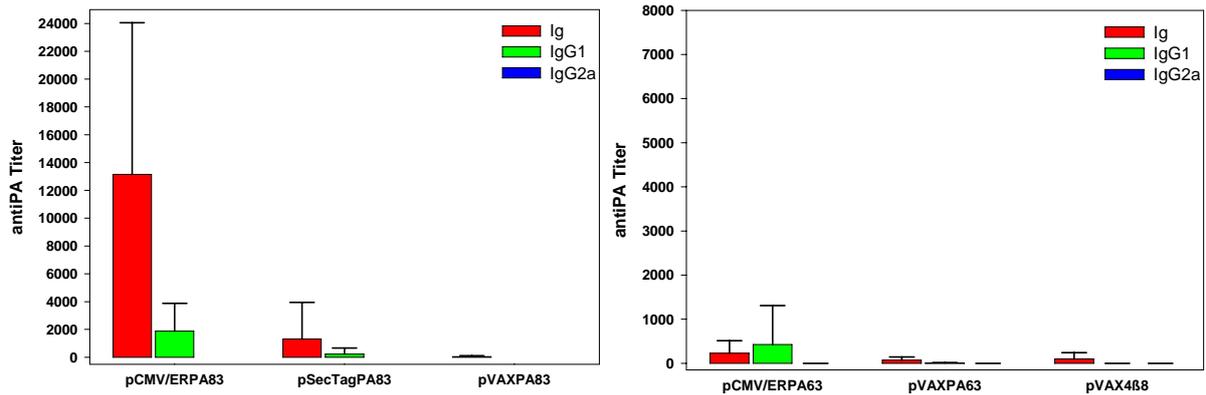


Abb. 20: AntiPA-Antiköpertiter nach GG DNA-Immunsierung von Balb/c-Mäusen  
 Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Meßwerte für gesamt Ig sowie die IgG-Subklassen 1 und 2a.  
 Die Endtiter der Einzeltiere ergeben sich als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe ( $2^n$ ) mit einem Wert, der um  $OD_{414\text{ nm}} = 0,1$  größer war als der Mittelwert der vergleichbaren Verdünnungsstufe für die negative Kotrollgruppe.

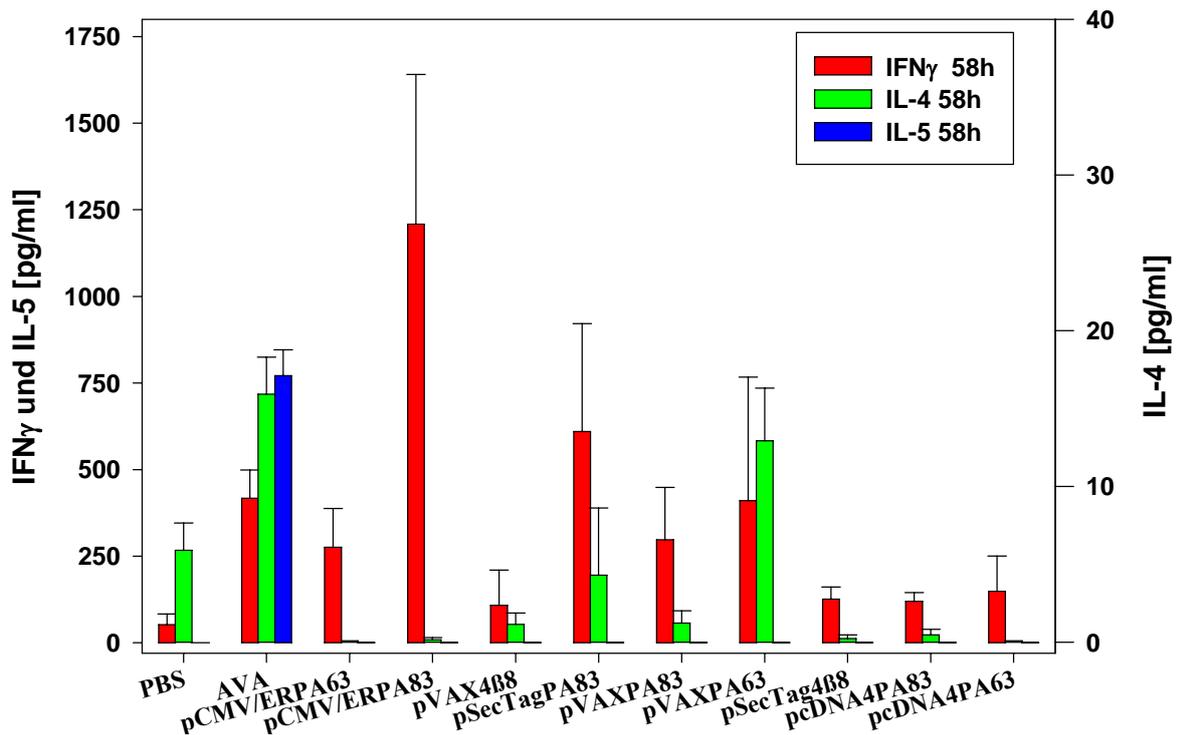


Abb. 21: Zytokinwerte der Milzzellkulturen von i. m. immunisierten Balb/c-Mäusen nach 58 h Inkubation mit rPA83  
 Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Einzeltierwerte einer Gruppe.  
 Die Einzeltierwerte ergeben sich aus den Meßwerten der mit rPA83 in vitro restimulierten Zellen minus der Werte für Zellen desselben Tieres ohne Restimulation.

Für die Messung der IL-4 und IL-5 Produktion wurde im Verlauf dieser Versuche ausgetestet, wie lange die gewonnenen Milzzellen in Primärkultur gehalten werden können und nach welcher Zeit eine hohe Ausbeute der 3 Zytokine, insbesondere von IL-4 und IL-5, nachweisbar ist. Dabei erwies sich das Schema einer Stimulierung der Zellen mit rPA83 für zunächst 60 h sowie einer Restimulierung, nach Abnahme von 100 µl des Überstandes und Wiederauffüllen der Kavitäten mit rPA83 haltigem Medium, für weitere 192 h als gut geeignet, um insbesondere die Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 nachweisen zu können. IFN $\gamma$  war für den Nachweis bereits nach 60 h Inkubation in ausreichender Menge vorhanden.

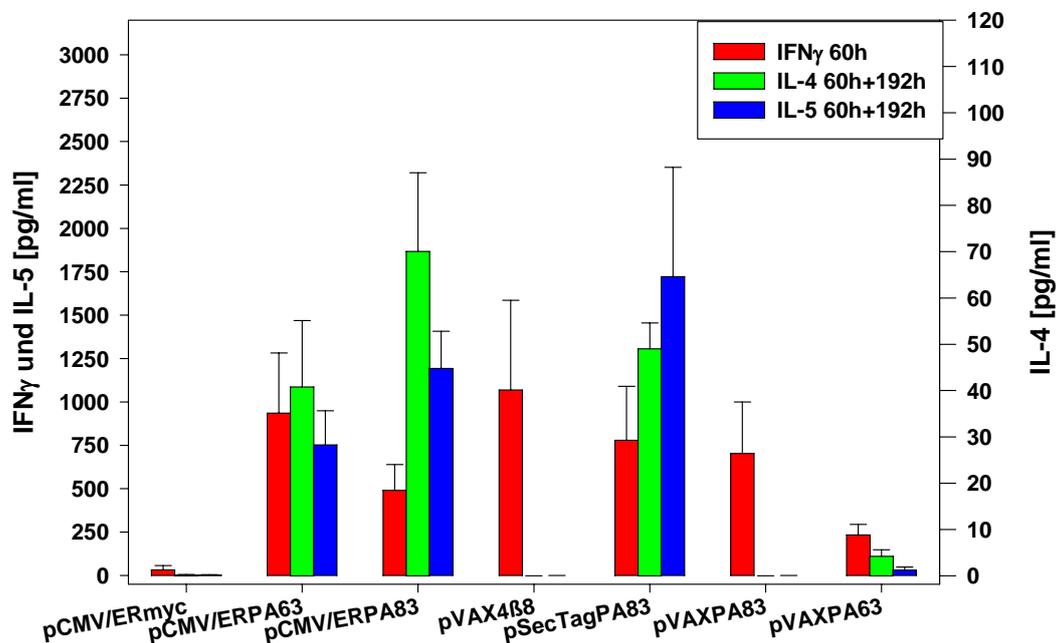


Abb. 22: Zytokin-Werte im Medium der Milzzellkulturen von GG immunisierten Balb/c-Mäusen nach Inkubation mit rPA83  
 Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Einzeltierwerte einer Gruppe. Die Einzeltierwerte ergeben sich aus den Meßwerten der in vitro mit rPA83 restimulierten Zellen minus der Werte für Zellen desselben Tieres ohne Restimulation.

Tabelle 5: Reagenten nach i. m. DNA-Immunisierung von Balb/c-Mäusen

Konstruktion	Anzahl Mäuse, die antiPA Ak bilden/Zahl der getesteten Tiere	Anzahl Mäuse, die PA spezifisches IFN $\gamma$ bilden/Zahl der getesteten Tiere	Anzahl Mäuse, die PA spezifisches IL-4 bilden/Zahl der getesteten Tiere	Gesamtzahl der Reagenten/Zahl der getesteten Tiere
pCMV/ER PA63	3/4	3/4	0/4	4/4
pCMV/ER PA83	4/5	4/5	0/5	5/5
psecTag 4 $\beta$ 8	0/5	2/5	0/5	2/5
pcDNA4 PA83	2/5	0/5	0/5	2/5
pcDNA4 PA63	3/4	1/4	0/4	3/4
pVAX 4 $\beta$ 8	2/5	1/5	0/5	2/5
pSecTag PA83	3/5	3/5	1/5	4/5
pVAX PA83	1/5	2/5	0/5	2/5
pVAX PA63	5/5	1/5	3/5	5/5

Tabelle 5a: Reagenten nach DNA-Immunisierung von Balb/c-Mäusen mittels Gene Gun

Konstruktion	Anzahl Mäuse, die antiPA Ak bilden/Zahl der getesteten Tiere	Anzahl Mäuse, die PA spezifisches IFN $\gamma$ bilden/Zahl der getesteten Tiere	Anzahl Mäuse, die PA spezifisches IL-4 bilden/Zahl der getesteten Tiere	Anzahl Mäuse, die PA spezifisches IL-5 bilden/Zahl der getesteten Tiere	Gesamtzahl der Reagenten/Zahl der getesteten Tiere
pCMV/ER PA63	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5
pCMV/ER PA83	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
pVAX 4 $\beta$ 8	2/5	4/5	0/5	0/5	4/5
pSecTag PA83	3/5	4/5	5/5	5/5	5/5
pVAX PA83	(2/5)*	5/5**	0/5	0/5	(5/5)
pVAX PA63	(3/6)*	(6/6)***	(4/6)*	(1/6)*	(6/6)

\* sehr geringe Werte

\*\* 2 Werte < 1000, 2 Werte < 500

\*\*\* alle Werte < 500

#### 4.3.2 DNA-Immunisierung im A/J-Mausmodell

Aufgrund der im A/J-Mausmodell gegebenen Möglichkeit, die protektive Potenz von Vakzinekandidaten nach einer Belastungsinfektion mit Lebendsporen von *B. anthracis*, Stamm STI, zu überprüfen, wurde im weiteren auf diese Inzucht-Linie zurückgegriffen. Die

vorausgegangenen Experimente in Balb/c-Mäusen zum Studium der Immunogenität von eukaryontischen Plasmid-Konstruktionen mit den Genen für das mature Protein PA83 und die physiologisch aktive Komponente PA63 hatten eine höhere Effektivität von PA83 ergeben. Deshalb wurden für die folgenden Versuche Expressionskassetten mit dem kompletten PA-Gen favorisiert. Darüber hinaus hatten sich in den Vorversuchen in Balb/c-Mäusen zur DNA-Immunisierung mittels Gen Gun die Konstruktionen pCMV/ER PA83 und pSecTag PA83 allen anderen Kandidaten sowohl in der Induktion von antiPA-Ak als auch von Th1- und Th2-basierten Zytokinen als überlegen erwiesen. Beide Vakzinekandidaten wurden daher in den Folgeversuchen allein und in Kombination weiter geprüft.

### Immunisierung

Weibliche A/J-Mäuse im Alter von ca. 10 Wochen wurden dreimal im Abstand von 2 Wochen mittels GG immunisiert. Die folgende Konstruktionen wurden eingesetzt:

- pCMV/ER PA83 (Retention des rekombinanten Proteins im ER), 14 Mäuse und
- pSecTag PA83 (Sekretion des rekombinanten Proteins), 13 Mäuse

Als Negativkontrolle wurden 10 Tiere mit dem Vektorplasmid pCMV/myc/ER behandelt. Die Belastungsinfektion mit  $1,5 \times 10^6$  Sporen vom Stamm STI in 100  $\mu$ l physiologischer Kochsalzlösung erfolgte i. p., 14 Tage nach der letzten Immunisierung.

Die ELISA- und Neutralisationstiter wurden 10 Tage nach der letzten Immunisierung bestimmt (Abb. 23 B).

### Ergebnisse der Immunisierung

Beide getesteten Konstruktionen erzeugten eine homogene humorale Antwort mit hohen antiPA gesamt Ig-Antikörpertitern, die hauptsächlich zur IgG1-Subklasse gehörten. Die Unterschiede in den Titer-Mittelwerten der beiden Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Bei einer technisch bedingten minimalen Verdünnungsstufe von 1:50 waren jedoch nur in 2 von 13 (pSecTag PA83) bzw. 8 von 14 (pCMV/ER PA83) Tieren ein 50 %iger Neutralisationstiter ( $NT_{50}$ ) von 1:75 – 1:250 nachweisbar. Der höhere  $NT_{50}$  in der mit pCMV/ERPA83 behandelten Gruppe im Vergleich zur pSecTagPA83 immunisierten Gruppe war signifikant ( $p=0.0152$ , Student's t-Test). Diese Titer liegen wesentlich niedriger als nach Immunisierung mit rPA und RIBI-Adjuvans ( $NT_{50}$  von 1 : 9.530, SE = 2.131, Abb. 9 B).

Die Abb. 23 enthält die ELISA-Daten der A/J-Gruppen im Vergleich zu den Daten der Balb/c-Mäuse aus dem Versuch unter Kapitel 4.3.1. A/J-Mäuse reagierten mit ca. 5fach und 10fach höheren Titern für gesamt Ig und IgG1 nach Immunisierung mit dem Plasmid pCMV/ER PA83 und mit 100fach höheren Titern für gesamt Ig und IgG1 nach Immunisierung mit dem Plasmid pSecTag PA83. Wie bei Balb/c-Mäusen dominierte auch in den A/J-Gruppen die IgG1-Antwort. Wenige Mäuse beider A/J-Gruppen hatten geringe IgG2a-Titer.

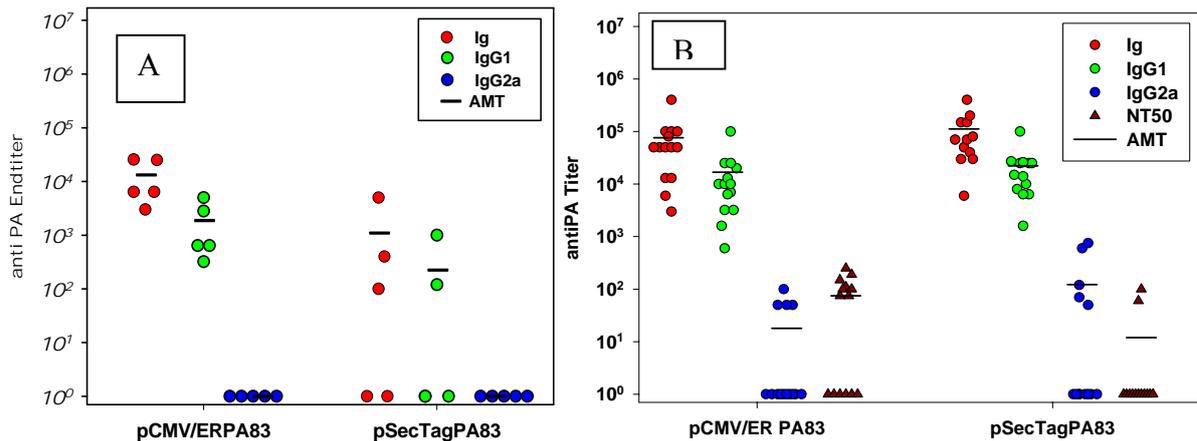


Abb. 23: AntiPA spezifische Titer von (A) Balb/c-Mäusen und (B) A/J-Mäusen nach DNA-Immunisierung mit der Gen Gun  
Die Titerwerte ergeben sich als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe ( $2^n$ ) mit einer  $OD_{414nm} \geq 0,1$ .

### Belastungsinfektion

Die i. p. Belastungsinfektion erfolgte 14 Tage nach der 3. Immunisierung mit  $1,5 \times 10^6$  Sporen vom Stamm STI, resuspendiert in 100  $\mu$ l NaCl, 0.1 % Gelatine. Nach einer Beobachtungszeit von 14 Tagen wurden die überlebenden Tiere durch Blutentzug getötet und die ELISA- bzw. Neutralisationstiter bestimmt.

Die Tiere der negativen Kontrollgruppe verstarben innerhalb von 4 Tagen. In der Gruppe pSecTag PA83 überlebten 5/6 (83 %) der Tiere, in der Gruppe pCMV/ER PA83 überlebten 4/7 (57 %), wobei 2 der verstorbenen Tiere (14 %) eine verlängerte Überlebenszeit hatten. Das Überleben beider Gruppen war damit statistisch signifikant besser als das der Negativgruppe. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren nicht signifikant (Abb. 24).

Die PA spezifischen Ig-Titer wie auch die Neutralisationstiter aller überlebenden Tiere stiegen nach der Infektion an (Tab. 6).

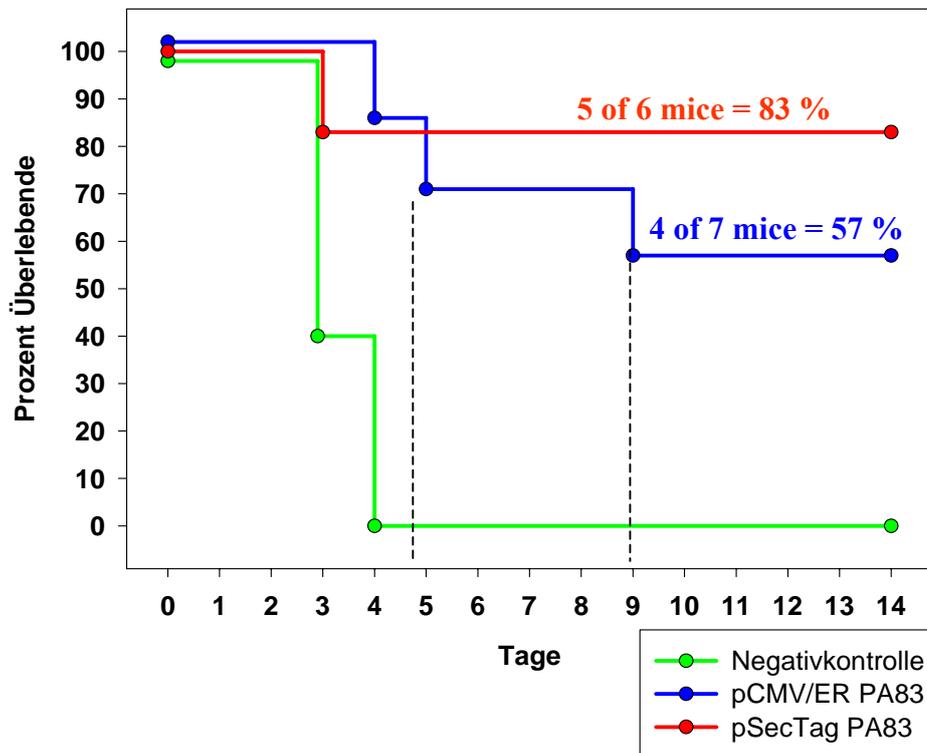


Abb. 24: Überlebensraten von A/J-Mäusen nach Belastungsinfektion mit  $1.5 \times 10^6$  Sporen ( $100 \times LD_{50}$ ) vom Stamm STI

Tab. 6: Titerwerte und Überlebensdaten von A/J-Mäusen nach DNA-Immunisierung mit der Gen Gun und Belastungsinfektion mit  $1,5 \times 10^6$  Sporen vom Stamm STI

Maus	Tod in Tagen nach Infektion	antiPA gesamt Ig Titer vor Infektion	Ltx NT <sub>50</sub> vor Infektion	antiPA gesamt Ig Titer nach Infektion	<u>Ltx</u> NT <sub>50</sub> nach Infektion
------	-----------------------------	--------------------------------------	------------------------------------	---------------------------------------	--

**pCMV/ER PA83**

1		100.000	150	>2.000.000	6.000
2		400.000	190	2.000.000	900
3		13.000	75	250.000	300
4		50.000	<50	600.000	100
5	3,9	6.000	<50		
6	9,2	50.000	<50		
7	4,9	80.000	<50		

**pSecTag PA83**

1		40.000	<50	1.000.000	600
2		70.000	<50	>> 2 Mio.	>6400
3		80.000	<50	>2.000.000	600
4		200.000	60	2.000.000	300
5		180.000	<50	1.000.000	180
6	3,3	30.000	<50		

#### 4.3.2.1 Immunisierung mit der Domäne 4 des PA im A/J-Mausmodell mittels Gen Gun und Belastungsinfektion mit Sporen vom Stamm STI

Eine weitere Verbesserung der Effektivität von DNA-Vakzinen sollte durch die Steuerung der Antigenpräsentation durch die exprimierenden Zellen erreicht werden. Dazu wurden Expressionskassetten entwickelt, die neben der antigenen Domäne 4 des PA-Gens mit optimierter eukaryontischer Codonsequenz das MHC Klasse II-Targetingsignal sowie die Ankersequenz der invarianten Kette der Maus enthielten. Letztere soll das rekombinante Protein in den MHC Klasse II-Präsentationsweg von APC's dirigieren. Diese Konstruktionen, im folgenden als pVAXivcPAd4 und pCMV/ERivcPAd4 bezeichnet, wurden im weiteren auf Immunogenität und Induktion einer protektiven Immunantwort geprüft.

Für die bestehenden Konstruktionen pCMV/ER PA83 und pSecTag PA83 (Abb. 25) sowie für beide Neuklonierungen (Abb. 26) wurde die Expression der Fusionsproteine nach Transfektion von COS7-Zellen überprüft.

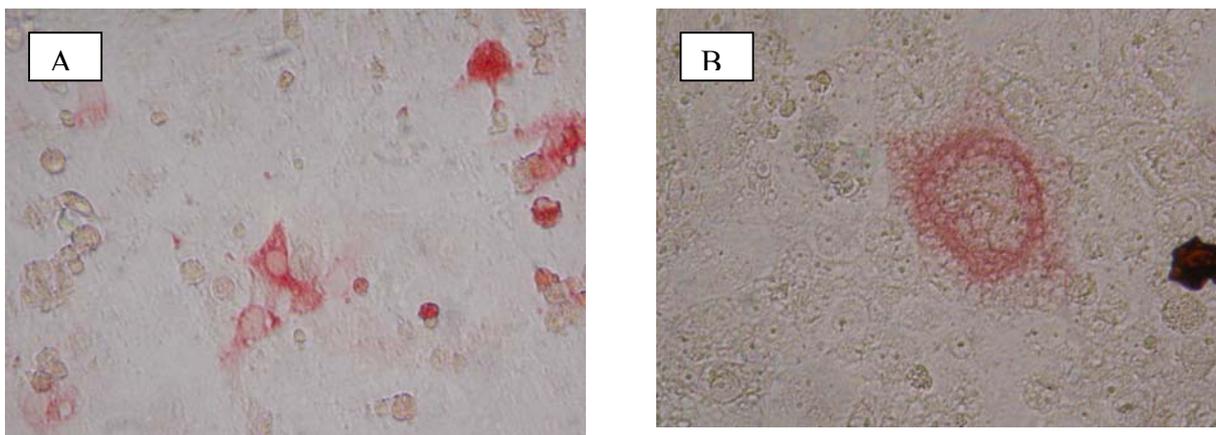


Abb. 25: Expression des PA83 aus (A) pCMV/ERPA83 und (B) pSecTag PA83 in COS7-Zellen

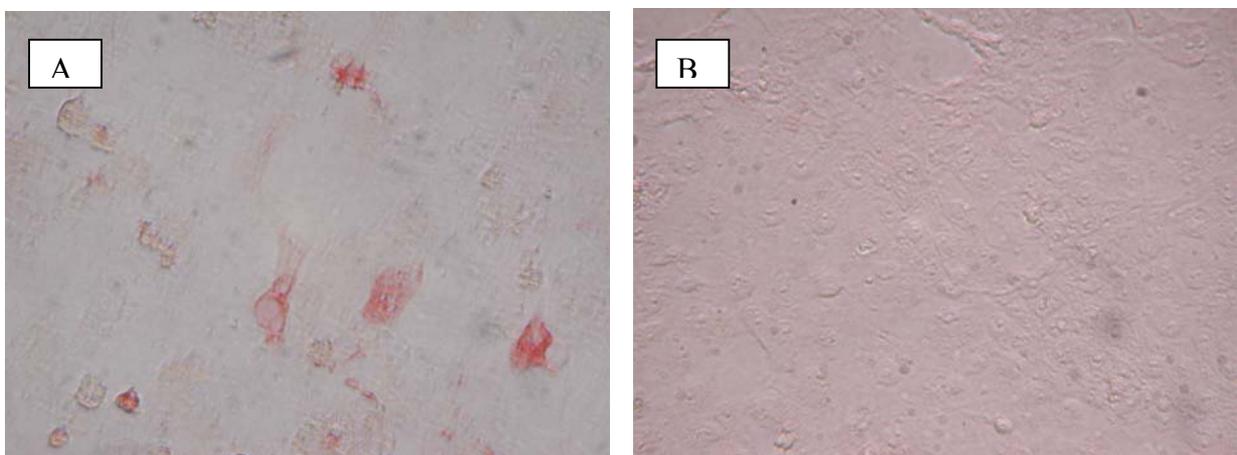


Abb. 26: (A) Expression des ivcPAd4-Fusionsproteins aus pVAXivcPAd4 in COS7-Zellen, (B) Zellen nach Transfektion mit dem Vektor ohne Fremdgen

## Immunisierung

Die Immunisierung erfolgte dreimal im Abstand von 14 Tagen mit ca. 1 µg Plasmid DNA pro Patrone, mittels Gene Gun. Gleichzeitig wurde der Einfluß der Erhöhung der DNA-Dosis bzw. der Verbreiterung der in die Immunisierung einbezogenen Hautfläche durch Applikation von 2 Patronen an unterschiedlichen Hautstellen gegenüber nur 1 Patrone geprüft. Die Blutentnahme erfolgte einen Tag vor der Belastungsinfektion. Die Infektion mit  $1,3 \times 10^6$  Sporen vom Stamm STI in 100 µl NaCl + 0,1 % Gelatine, erfolgte i. p., 19 Tage nach der 3. Immunisierung.

Es wurden die folgenden Versuchsgruppen gebildet:

A	pVAX ivcPAD4	1 Patrone/Immunisierung	10 Mäuse
A <sub>2</sub>	pVAX ivcPAD4	2 Patronen/Immunisierung	6 Mäuse
B	pCMV/ER ivcPAD4	1 Patrone/Immunisierung	10 Mäuse
B <sub>2</sub>	pCMV/ER ivcPAD4	2 Patronen/Immunisierung	6 Mäuse

## Ergebnisse

Das Plasmid pVAXivcPAD4 induzierte bis zu 100fach höhere antiPA ELISA-Titer als das Plasmid pCMV/ERivcPAD4. Für letzteres reagierte die Mehrzahl der Tiere erst bei 2 Patronen pro Immunisierung, während bei pVAXivcPAD4 kein Unterschied zwischen der Applikation von 1 und 2 Patronen pro Immunisierung feststellbar war (Abb. 27 und 28).

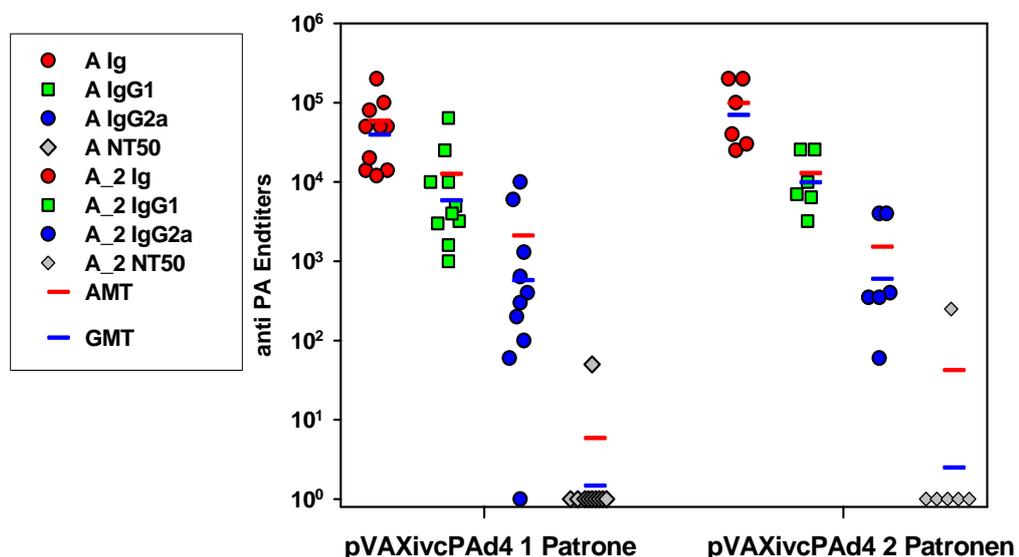


Abb. 27: Immunisierung mit pVAXivcPAD4 mittels Gen Gun im A/J-Mausmodell  
AntiPA-Titer der Einzeltiere vor dem Belastungsinfektion, nach Applikation von 1 oder 2 Patronen pro Immunisierung  
Die Titerwerte ergeben sich als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe (2<sup>n</sup>) mit einer OD<sub>414nm</sub> ≥ 0,1.

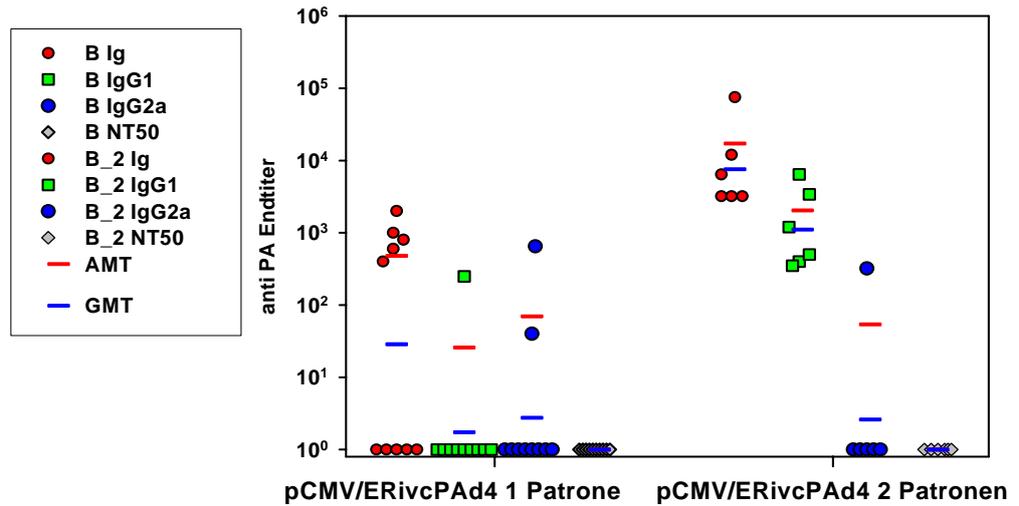


Abb. 28: : Immunisierung mit pCMV/ERivcPA4 mittels Gen Gun im A/J-Mausmodell  
 AntiPA-Titer der Einzeltiere vor der Belastungsinfektion, nach Applikation von 1 oder 2  
 Patronen pro Immunisierung  
 Die Titerwerte ergeben sich als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe ( $2^n$ ) mit einer  $OD_{414nm} \geq 0,1$ .

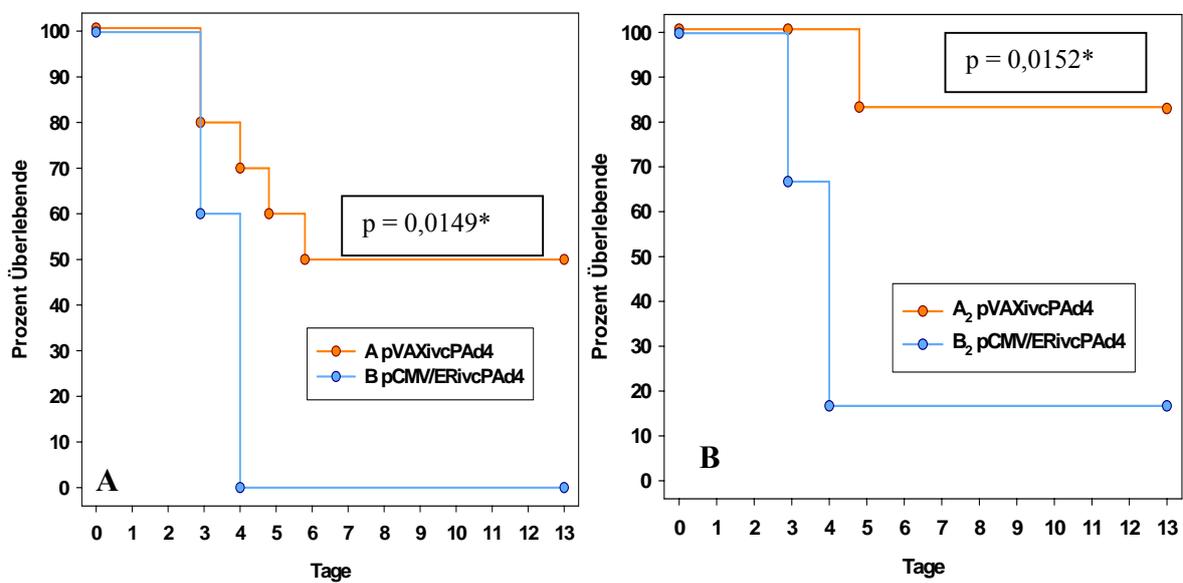


Abb. 29: Überlebensraten von A/J-Mäusen nach Immunisierung mit pVAXivcPA4 und  
 pCMV/ERivcPA4. A: 1 Patronen pro Immunisierung, B: 2 Patronen pro Immunisierung;  
 Belastungsinfektion mit  $1.3 \times 10^6$  Sporen ( $100 \times LD_{50}$ ) vom Stamm STI  
 \* log rank test, Vergleich der Gruppen A und B

Die Unterschiede sowohl in den ELISA-Titern als auch in den Überlebensraten zwischen den beiden Konstrukten sind statistisch signifikant, nicht jedoch die entsprechenden Unterschiede zwischen einfacher und doppelter Dosierung, obwohl die Überlebensrate für pVAXivcPAd4 nach doppelter Immunisierung von 50 % auf 83 % stieg (Abb. 29). Für die weiteren Versuche wurde dennoch davon ausgegangen, daß bei einer Erhöhung der DNA-Menge pro Immunisierung eine steigende Überlebensrate zu erwarten war.

#### 4.3.2.2 Optimierung der DNA-Applikation mittels Gen Gun im A/J-Mausmodell

In der folgenden Versuchsanordnung wurden die bereits einmal erfolgreich getesteten Vakzinekandidaten in einem einheitlichen Versuchsansatz miteinander verglichen. Dabei konnten die verabreichten DNA-Dosen erhöht werden. Pro Immunisierung wurden 2 Patronen verschossen. Außerdem wurde die Beladung der Patronen mit Plasmid-DNA durch ein verbessertes Protokoll gesteigert. Zusätzlich zu den Einzelplasmiden wurde eine Kombination aus den Plasmiden pSecTag PA83 und pVAXivcPAd4 getestet.

##### Immunisierung

Weibliche A/J-Mäuse, 8-10 Wochen alt, wurden dreimal mit je 4-6 µg DNA im Abstand von 14 Tagen immunisiert. Die Blutentnahme erfolgte 15 Tage und der Belastungsinfektion mit  $1.1 \times 10^6$  STI Sporen 23 Tage nach der letzten Immunisierung.

Folgende Versuchsgruppen wurden gebildet:

Gruppe A: pVAXivcPAd4	2 Patronen/Immunisierung	7 Mäuse
Gruppe B: pCMV/ER PA83	2 Patronen/Immunisierung	6 Mäuse
Gruppe C: pSecTag PA83	2 Patronen/Immunisierung	8 Mäuse
Gruppe D: pVAXivcPAd4 pSecTag PA83	1 Patrone und 1 Patrone/Immunisierung	7 Mäuse

Die Daten der antiPA ELISA-Titer und der Ltx-Neutralisationstiter sind in den Abb. 30 A-D enthalten. Die Überlebensraten im Belastungsinfektions-Versuch zeigt Abb. 31.

Bei vergleichbar hohen antiPA gesamt Ig und IgG1-Titern aller Versuchsgruppen gab es deutliche Unterschiede in den antiPA IgG2a Titern sowie in den Ltx-NT<sub>50</sub>. Erstere waren in den Versuchsgruppen, die das Plasmid pVAXivcPAd4 erhalten hatten (Gruppen A und D) am höchsten. Gleichzeitig waren in diesen Gruppen keine NT<sub>50</sub> ≥ 1:50 nachweisbar (Ausnahme: 1 Tier in Gruppe D).

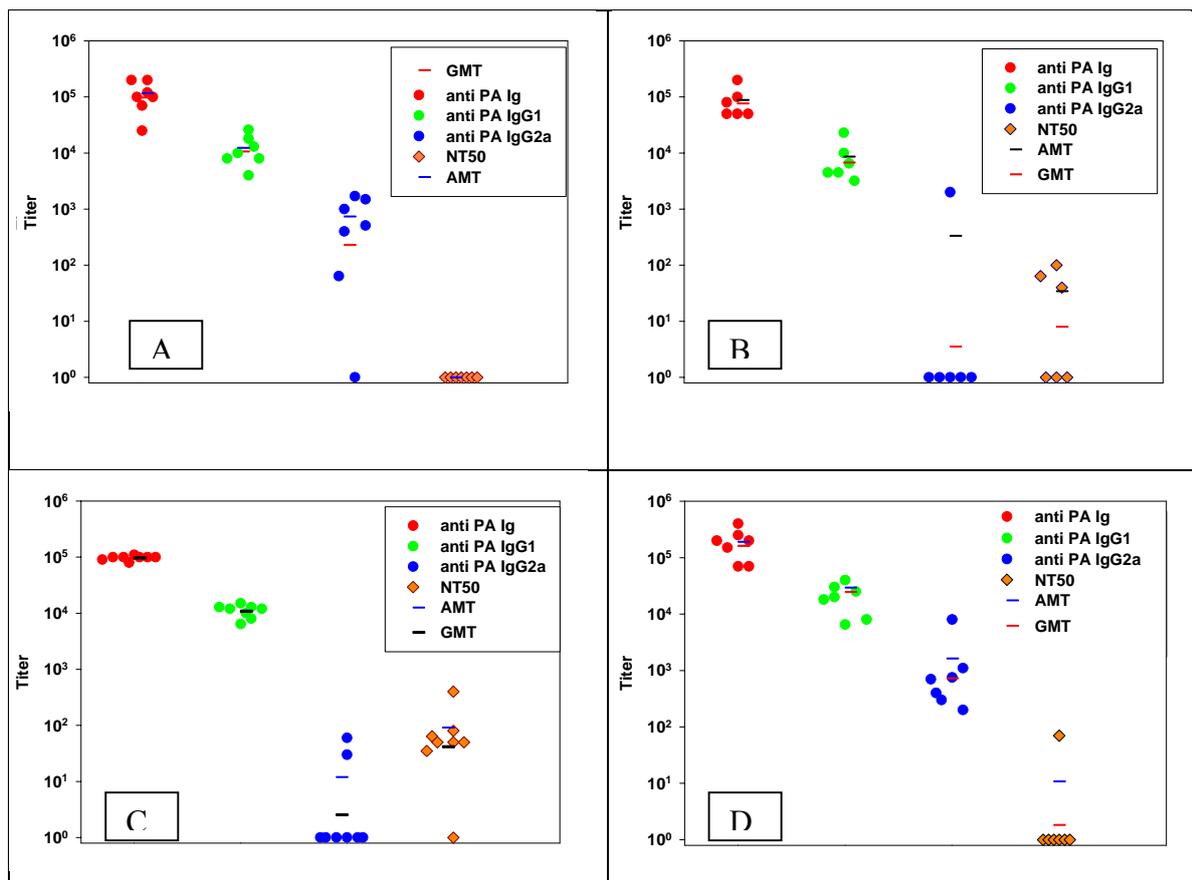
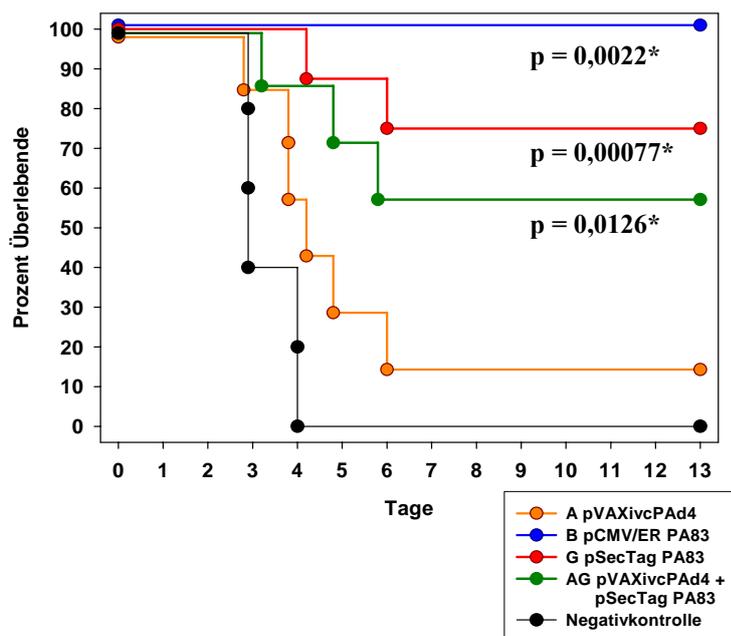


Abb. 30: AntiPA ELISA- und Ltx-Neutralisationstiter nach optimierter DNA-Immunisierung mit der Gen Gun im A/J-Mausmodell

A: pVAXivcPAD4; B: pCMV/ERPA83; C: pSecTag PA83; D: pSecTagPA83 + pVAXivcPAD4  
 Die Titerwerte ergeben sich als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe ( $2^n$ ) mit einer  $OD_{414nm} \geq 0,1$ .



B: pCMV/ER PA83 (6 von 6)  
 G: pSecTag PA83 (6 von 8 = 75 %)  
 A/G: pVAXivc PAD4 + pSecTag PA83 (4 von 7 = 57 %)  
 A: pVAXivc PAD4 (1 von 7 = 14 %)

Abb. 31: Belastungsinfektion mit  $1,1 \times 10^6$  ( $100 \times LD_{50}$ ) Sporen vom Stamm STI nach optimierter DNA-Immunisierung mit der Gen Gun im A/J-Mausmodell

\* Wilcoxon Test, Vergleich mit der Negativkontrolle

Diese Werte sind ähnlich denen beim vorangegangenen Versuch mit dieser Konstruktion (s. Abb. 27). Während im ersten Versuch jedoch 83 % der Tiere überlebten, verstarben in der Wiederholung 90 % der Tiere.

Die Überlebensraten für die mit aus den Vorversuchen übernommenen Vakzinekandidaten immunisierten Gruppen (pSecTagPA83 und pCMV/ERPA83) waren mit 75 % bzw. 100 % ähnlich hoch wie in den vorangegangenen Versuchen und signifikant besser (Wilcoxon-Test) als jene der Negativkontrollgruppe (vergl. Abb. 24 mit Abb. 31).

Kombiniert man die Daten aller mit pCMV/ER PA83 oder pSecTag PA83 per GG immunisierten A/J-Mäuse (Kapitel 4.3.2 und 4.3.4), ergibt sich für ersteres Plasmid insgesamt eine Schutzrate von 79 % (11/14 Mäusen) und für letzteres eine Schutzrate von 77 % (10/13 Mäusen).

Eine Gegenüberstellung der antiPA-Titer bzw. der Ltx-Neutralisationstiter einerseits und der Überlebens-Daten andererseits (Abb. 32 und Tab. 6) zeigt keine Korrelation für diese Parameter. In der mit pSecTag PA83 immunisierten Gruppe starben 3 Tiere mit antiPA-Titern von 1:30.000 und 1:100.000. Zwei der Tiere hatten NT<sub>50</sub> von 1:35 und 1:400. Gleichzeitig überlebten 5 Tiere ohne meßbaren NT<sub>50</sub>. In der mit pCMV/ER PA83 immunisierten Gruppe starben 3 Tiere mit antiPA-Titern zwischen 1:6.000 und 1:80.000, die keinen meßbaren NT<sub>50</sub> hatten. Auch hier überlebten 4 Tiere ohne nachweisbaren NT<sub>50</sub>.

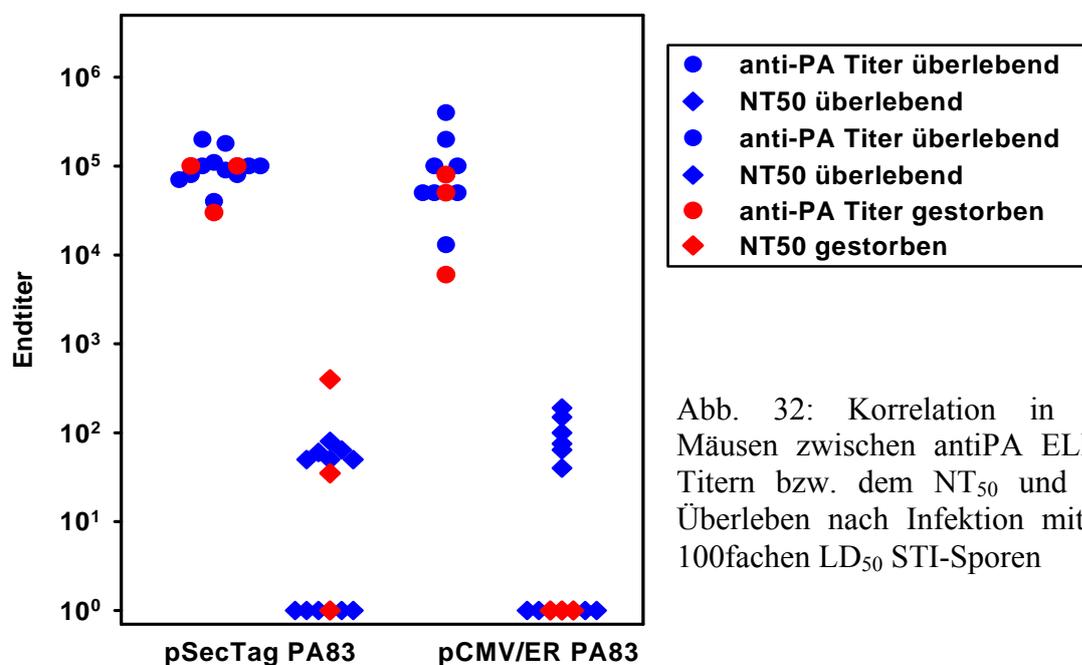


Abb. 32: Korrelation in A/J-Mäusen zwischen antiPA ELISA-Titern bzw. dem NT<sub>50</sub> und dem Überleben nach Infektion mit der 100fachen LD<sub>50</sub> STI-Sporen

### 4.3.3 DNA-Immunisierung mit Kombinationen aus PA83- und BclA-kodierenden Plasmiden mit der Gen Gun im NMRI-Mausmodell

Für die im folgenden beschriebenen Versuche wurde auf das neu etablierte Auszucht-Mausmodell zurückgegriffen. Dieses Modell ermöglicht die Prüfung der Schutzwirkung der Vakzinekandidaten nach einer Belastungsinfektion mit vollvirulenten Sporen vom Stamm Ames.

Die aus der Literatur bekannten unterschiedlichen Tiermodelle für Infektionsversuche mit *B. anthracis* haben deutlich gemacht, daß verschiedene Tierarten mit ganz unterschiedlicher Sensitivität auf die Infektion reagieren. Während z. B. Ratten hochempfindlich gegenüber der Wirkung des Letaltoxins sind, scheint für Mäuse die Kapsel ein starker Virulenzfaktor zu sein. Damit wird deutlich, daß eine wirksame Immunprophylaxe sowohl die Toxinwirkung als auch die Vermehrung des Erregers hemmen sollte. Dafür wurden zwei neue Expressionskassetten für das „*Bacillus* collagen-like protein of anthracis (BclA), ein Immunogen aus dem Exosporium von Bazillen (Sylvestre et al., 2002; Steichen et al., 2003), im Vektor pSecTag entwickelt, wobei das rekombinante Protein entweder mit oder ohne die vektoreigenen Marker (myc-Epitop und 6 x His) exprimiert wird.

Beide Konstruktionen wurden durch Sequenzierung bestätigt und die Expression des BclA in transfizierten COS7-Zellen überprüft (Abb. 33).

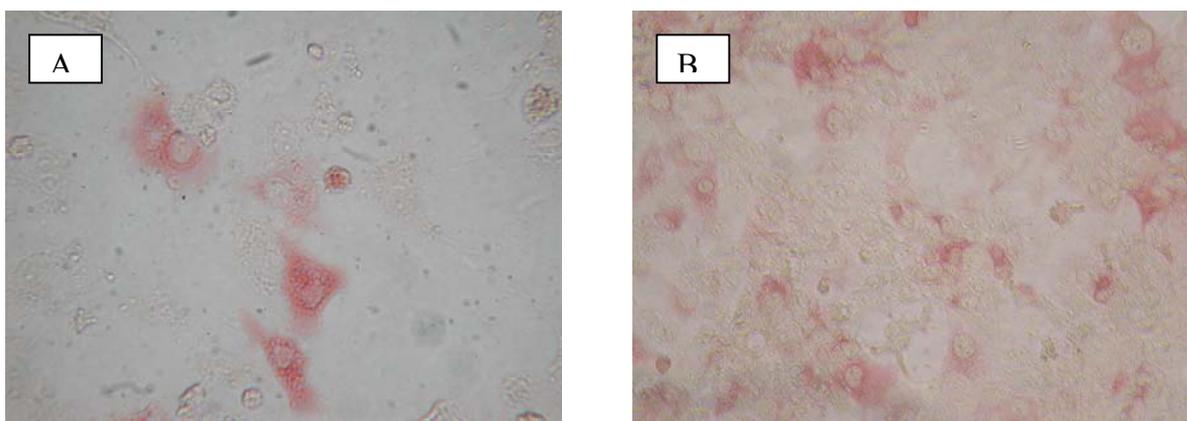


Abb. 33: Expressionstest für das bclA-Gen im Vektor pSecTag (A) mit myc- und His-Marker und (B) ohne Marker

Die im folgenden beschriebene Versuchsanordnung stellt den weltweit ersten Versuch dar, Auszuchtmäuse durch eine DNA-Vakzinierung gegen eine Infektion mit vollvirulentem *B. anthracis* zu schützen. Für die bislang einzigen publizierten Versuche zur Belastungsinfektion

von Auszuchtmäusen mit einem virulenten Stamm (Brossier et al., 2000; 2002) waren rekombinante Lebendsporen von *B. anthracis* bzw. rPA in Verbindung mit Formalin inaktivierten Sporen eines avirulenten *B. anthracis* zur Immunisierung verwendet worden. Es war zu prüfen, ob die im A/J-Mausmodell erfolgreich getesteten Konstruktionen pSecTag PA83 und pCMV/ER PA83 bzw. deren Kombination auch im Auszuchtmausmodell eine protektive Wirkung haben und ob die durch eine anti-PA Immunisierung induzierte Protektivität durch eine gleichzeitige anti-Sporen Immunisierung verstärkt werden kann.

Es wurden die folgenden Versuchsgruppen gebildet:

Gruppe N	pSecTag 2B	2 Patronen/Immunisierung	10 Mäuse
Gruppe A	pVAXivcPA4	2 Patronen/Immunisierung	10 Mäuse
Gruppe S	pSecTag BclAA1	2 Patronen/Immunisierung	10 Mäuse
Gruppe SBG	pSecTagBclAA1	1 Patrone/Immunisierung	10 Mäuse
	pCMV/ER PA83 + pSecTag PA83 (Gemisch)	1 Patrone/Immunisierung	
Gruppe BG	pCMV/ER PA83	1 Patrone/Immunisierung	10 Mäuse
	pSecTag PA83	1 Patrone/Immunisierung	
Gruppe P	rPA83 + RIBI und STI Sporen		10 Mäuse

### Immunisierung

Die Immunisierung erfolgte (außer für Gruppe P) dreimal im Abstand von 14 Tagen mit mindestens 1,2 µg DNA pro Patrone (pVAXivcPA4) bis maximal 2,9 µg DNA pro Patrone (pCMV/ERPA83). Die Positivkontrolle wurde zweimal mit je 25 µg rPA83 plus RIBI-Adjuvans und am Tag 28 mit  $9,6 \times 10^5$  Sporen vom Stamm STI, s. c., immunisiert. Die Titerwerte dieser Gruppe enthält Abb. 8. Die Blutentnahme erfolgte 21 Tage nach der letzten Immunisierung. Die Abb. 34 enthält die antiPA ELISA-Titer sowie die Ltx-NT<sub>50</sub> für jede Versuchsgruppe. In den Seren der Negativkontrollgruppe wurden keine Ak gegen PA83 oder BclA nachgewiesen.

Nach Immunisierung mit dem Genfragment für die Domäne 4 des PA (Gruppe A) gleichen die Titerwerte jenen aus den entsprechenden Versuchen im A/J-Mausmodell (Abb. 27). In der Gruppe BG wurden erstmalig die beiden Vakzinekandidaten pCMV/ERPA83 und pSecTagPA83 in Kombination eingesetzt. Die Titer für antiPA gesamt Ig und IgG1 sind in dieser Gruppe vergleichbar mit den durch die einzelnen Konstruktionen induzierten Titern im A/J-Mausmodell. Wie A/J-Mäuse haben auch NMRI-Mäuse nach Immunisierung mit PA exprimierenden Plasmiden nur vereinzelt einen NT<sub>50</sub> > 1:50 (vergl. Abb. 30). In der Gruppe

SBG wurde erstmalig eine Mischung aus den Plasmiden pCMV/ERPA83 und pSecTagPA83 in Verbindung mit dem das Sporenantigen kodierenden Plasmid pSecTag BclA eingesetzt. Die antiPA ELISA-Titer sind gleich denen in der BG-Gruppe, die antiBclA ELISA-Titer gleich denen in der S-Gruppe. Ein  $NT_{50} > 1:50$  war auch in dieser Gruppe nicht nachweisbar.

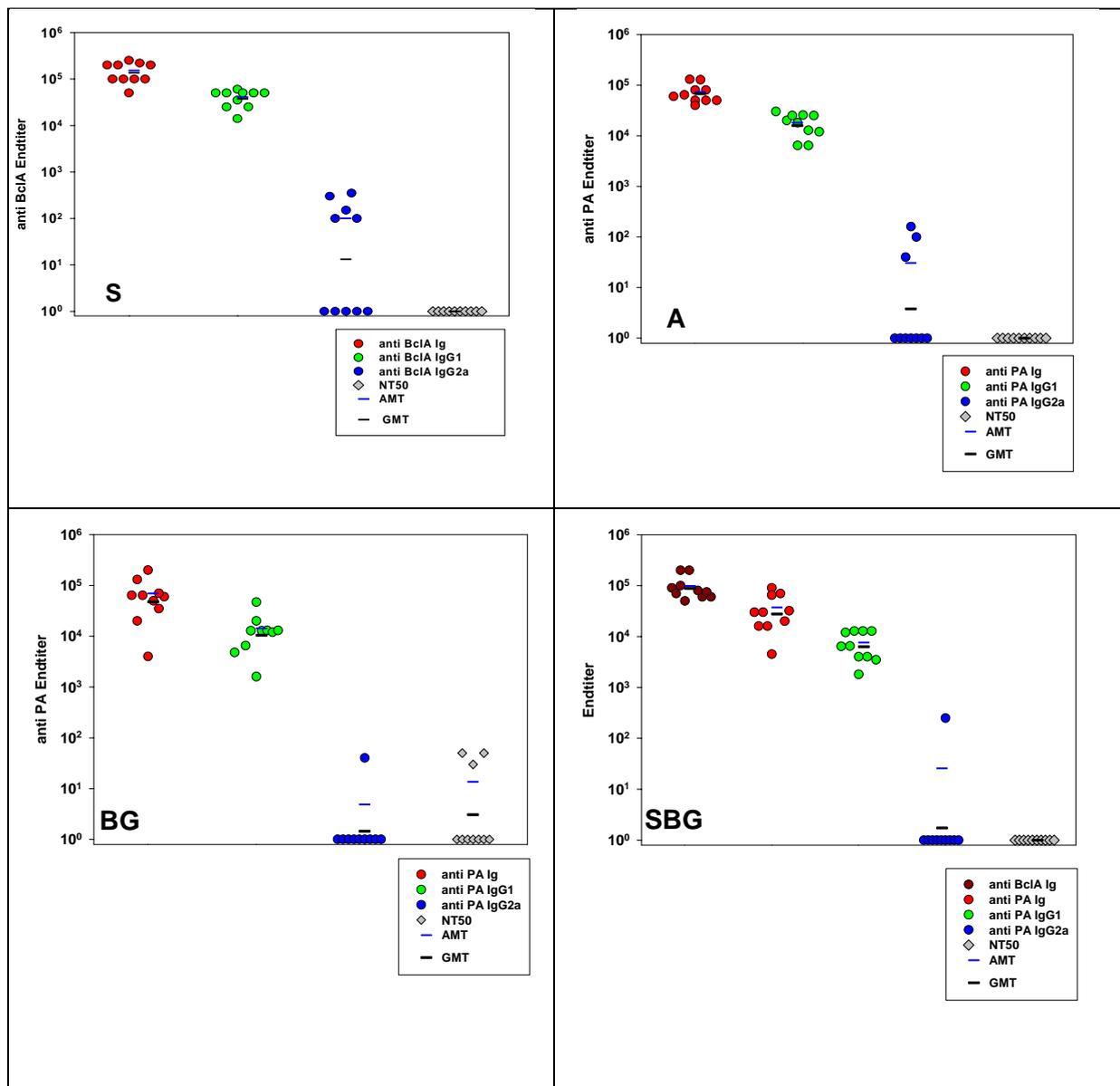


Abb. 34: AntiPA ELISA- und Neutralisationstiter für NMRI-Mäuse nach Immunsierung mit der Gen Gun, Einzeltitertiter vor der Belastungsinfektion

S: pSecTag BclA, 2 Patronen/Immunsierung

A: pVAXivcPA4, 2 Patronen/Immunsierung

BG: pCMV/ER PA83 und pSecTag PA83, je 1 Patrone/Immunsierung

SBG: pSecTag BclA und pCMV/ER PA83 + pSecTag PA83, je 1 Patrone/Immunsierung

Die Titerwerte ergeben sich als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe ( $2^n$ ) mit einer  $OD_{414nm} \geq 0,1$ .

## Belastungsinfektion

Die Belastungsinfektion mit  $9,34 \times 10^2$  Sporen Ames (ca.  $25 \times LD_{50}$ ), s. c., erfolgte 28 Tage nach der letzten Immunisierung (Abb. 35). Mit dem log rank-Test wurden die Unterschiede in den Überlebensraten für folgende Gruppen auf Signifikanz geprüft:

N gegenüber A; N gegenüber S; N gegenüber BG; N gegenüber SBG; N gegenüber P; S gegenüber BG; S gegenüber SBG und BG gegenüber SBG. Davon war nur das Überleben der Positivgruppe sowie die Schutzrate der Gruppe SBG, d. h. der Kombination aus antiPA- und anti-BclA Immunisierung, signifikant besser als jene der Negativgruppe.

Das Ergebnis zeigt erstmalig die Möglichkeit, eine Auszucht-Mauslinie mittels DNA-Immunisierung zumindest partiell gegen eine Infektion mit vollvirulentem *B. anthracis* zu schützen.

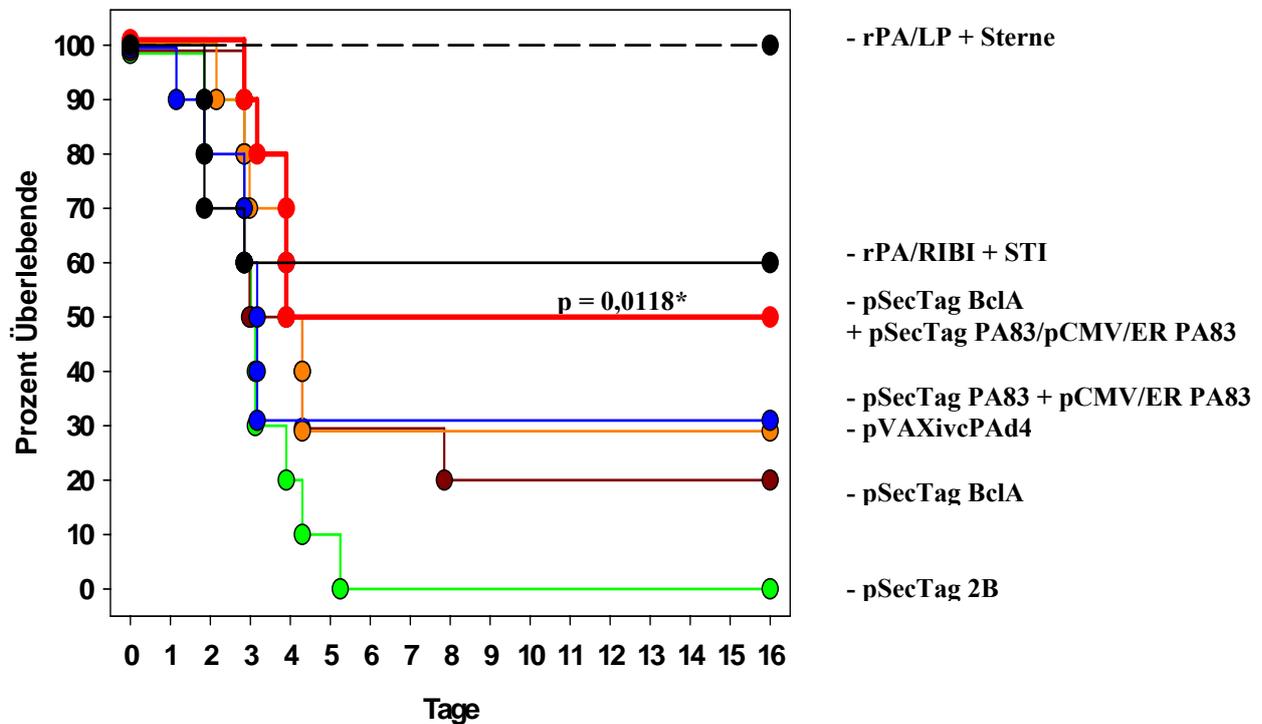


Abb. 35: Überleben von NMRI-Mäusen nach DNA-Immunisierung mit der Gen Gun und Belastungsinfektion mit  $9,3 \times 10^2$  Sporen ( $25 \times LD_{50}$ ) vom Stamm Ames

\* log rank Test, Vergleich zur Negativkontrolle (pSecTag2B)

#### 4.3.4 DNA-Immunsierung von Kaninchen

Obwohl alle orientierenden Fragestellungen zur Immunogenität von Vakzinekandidaten sinnvoll im Mausmodell bearbeitet werden können, ist die Beurteilung der Belastbarkeit der Immunantwort im Mausmodell nur bedingt möglich. In publizierten Studien wurde gezeigt, daß eine dem Menschen vergleichbare Immunität im Kaninchen zu erzeugen ist. Im nächsten Schritt wurde daher ein orientierender Versuch zur Immunisierung von Kaninchen mit optimierten Varianten der Vakzinekandidaten durchgeführt. Für die Versuche stand ein nichtkommerzielles Versuchsadjuvans (Vaxfectin) zur DNA-Immunsierung der Firma Vical (San Diego, Kalifornien), auf der Basis einer schriftlichen Vereinbarung, zur Verfügung.

Unter Verwendung von Tieren der Rasse New Zealand White (Harlan, Deutschland), weiblich, 1,5 bis 2 kg, wurden die folgenden Versuchsgruppen gebildet:

Gruppe N	pSecTag2B pCMV/myc/ER	3 Kaninchen
Gruppe SBG	pSecTagBclA pCMV/ER PA83 pSecTag PA83	3 Kaninchen

Die Immunisierung erfolgte mit je 1ml Vaxfectin-DNA-Lösung. Diese wurde aus 0,5 ml einer Mischung von gleichen Teilen Plasmid-Lösungen (2 mg/ml in 2 x PBS) und 0,5 ml des in Endotoxin freiem Wasser gelösten Vaxfectins hergestellt. Die Formulierung enthielt somit 1mg DNA in 1 x PBS. Die Applikation erfolgte intramuskulär, je 500 µl in beide Hinterläufe. Für die Negativgruppe wurden die beiden Vektorplasmide im Verhältnis 2:1 (pSecTag2B : pCMV/myc/ER) eingesetzt. Die Immunisierung erfolgte dreimal im Abstand von 27 und 25 Tagen, die Blutentnahme jeweils vor der Immunisierung und unmittelbar vor der Belastungsinfektion. Die Infektion mit  $2,6 \times 10^6$  Sporen vom Stamm Ames ( $1000 \times LD_{50}$ ) erfolgte für die Negativgruppe 25 Tage und für die Versuchsgruppe 32 Tage nach der letzten Immunisierung. Die Dreifachimmunisierung mit den antigenkodierenden Plasmiden führte zu einem signifikanten Anstieg der antiPA-Titer ( $p = 0,00952$ ) und der antiBclA-Titer ( $p = 0,00531$ , Student t-Test mit logarithmierten Titerwerten) im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 36). Die Belastungsinfektion überlebten 2 von 3 Tieren der Versuchsgruppe über 14 Tage Beobachtungsdauer, während in der Negativkontrolle alle Tiere innerhalb von 4 Tagen verstarben. Aufgrund der zu geringen Tierzahl ist dieser Unterschied nicht signifikant. Das verstorbene Tier hatte den höchsten antiBclA-Titer der Gruppe und als einziges Tier einen meßbaren  $NT_{50}$  von 1:10.

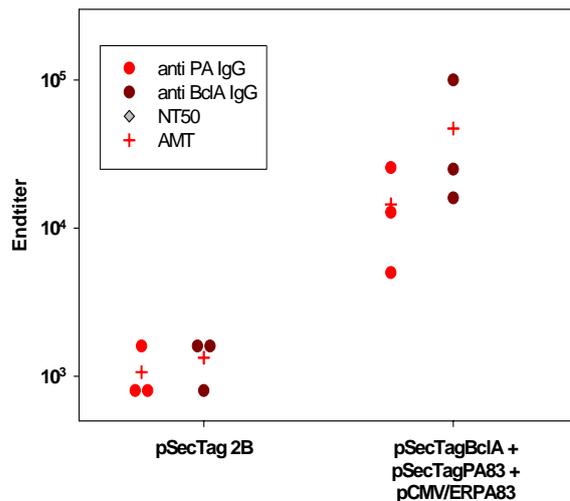


Abb. 36: AntiPA- und antiBclA-Titer nach DNA-Immunsierung von Kaninchen mit PA83- und BclA-kodierenden Plasmiden  
**Die Titerwerte ergeben sich als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe (2n) mit einer OD<sub>414nm</sub> ≥ 0,1.**

#### 4.3.5 DNA-Immunsierung von Schafen

Parallel zu den Untersuchungen der Immunogenität und Protektivität einer DNA-Vakzine in Kaninchen wurden zwei Plasmid-Kombinationen auf Immunogenität in Schafen getestet. Dabei sollte auch der Einfluß des DNA-Adjuvans Vaxfectin (Vical) auf die humorale Immunantwort geprüft werden. Die Versuche an Schafen waren Thema einer in der Arbeitsgruppe angefertigten Diplomarbeit (Aichler 2004). Die Ergebnisse wurden in Hahn et al. (2004) und (2005b) publiziert.

Unter Verwendung von unter natürlichen Bedingungen auf dem Versuchsgut Oberer Lindenhof der Universität gehaltenen Tieren der Rasse Merino, weiblich, 8-9 Monate alt, wurden die folgenden Versuchsgruppen mit je 3 Tieren gebildet:

- A: rPA83 + Aluminiumhydroxyd (Positivkontrolle)
- B: pCMV/ER PA83 + pSecTag PA83 + Vaxfectin
- C: pVAXivcPA4 + pSecTag PA83 + Vaxfectin
- D: pCMV/ER PA83 + pSecTag PA83
- E: pVAXivcPA4 + pSecTag PA83

Die Immunisierung der Gruppen B-E erfolgte mit je 1ml Vaxfectin-DNA-Lösung. Diese wurde aus 0,5 ml einer Mischung von gleichen Teilen Plasmid-Lösungen (2 mg/ml in 2 x PBS) und 0,5 ml des in Endotoxin freiem Wasser gelösten Vaxfectins hergestellt. Die Formulierung enthielt somit 1mg DNA in 1 x PBS und 750 nmol Adjuvans. Die Applikation erfolgte intramuskulär, abwechselnd in die Innenmuskulatur der Oberschenkel. Die Tiere der als Positivkontrolle dienenden Gruppe A erhielten jeweils 25 µg rPA83 in Aluminiumhydroxyd (s. Kap. 3.16.4). Die Immunisierung erfolgte dreimal am Tag 0, 21 und

48, die Blutentnahme zur Bestimmung von PA spezifischem IgG vor der Immunisierung sowie 1 Monat, 5 und 11 Monate nach der 3. Immunisierung. Als Negativkontrollen wurden die Seren jedes Tieres vor der 1. Immunisierung sowie Seren von naiven Tieren derselben Herde, 11 Wochen nach Versuchsbeginn, verwendet.

Der ELISA IgG-Titer der mit rPA83 immunisierten Gruppe war bis zur Messung einen Monat nach der letzten Immunisierung deutlich höher als der aller DNA vakzinierten Tiere. Über diesen Zeitraum stiegen auch die Titer der DNA vakzinierten Tiere kontinuierlich an, wobei ab der 2. Immunisierung höhere Titer in den Gruppen mit als ohne Adjuvansgabe gemessen wurden. Bei der Titerbestimmung ca. 1 Jahr nach Immunisierungsbeginn (11 Monate nach der 3. Immunisierung) war der IgG-Titer der Protein immunisierten Gruppe signifikant abgesunken während sich der Titer in Gruppe C nur unwesentlich verändert hatte (Abb. 37). Aufgrund der kleinen Tierzahl und der zu hohen Abweichung 1 Tieres war der Unterschied im mittleren Titer zwischen der Gruppe C und allen anderen Gruppen zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant. Gemeinsam mit der Gruppe B ( $p = 0,0001$ ) und der Positivkontrollgruppe A ( $p = 0,0001$ ) waren die Titerwerte der Gruppe C ( $p = 0,045$ ) signifikant höher als jene der naiven Kontrolltiere zu diesem Zeitpunkt.

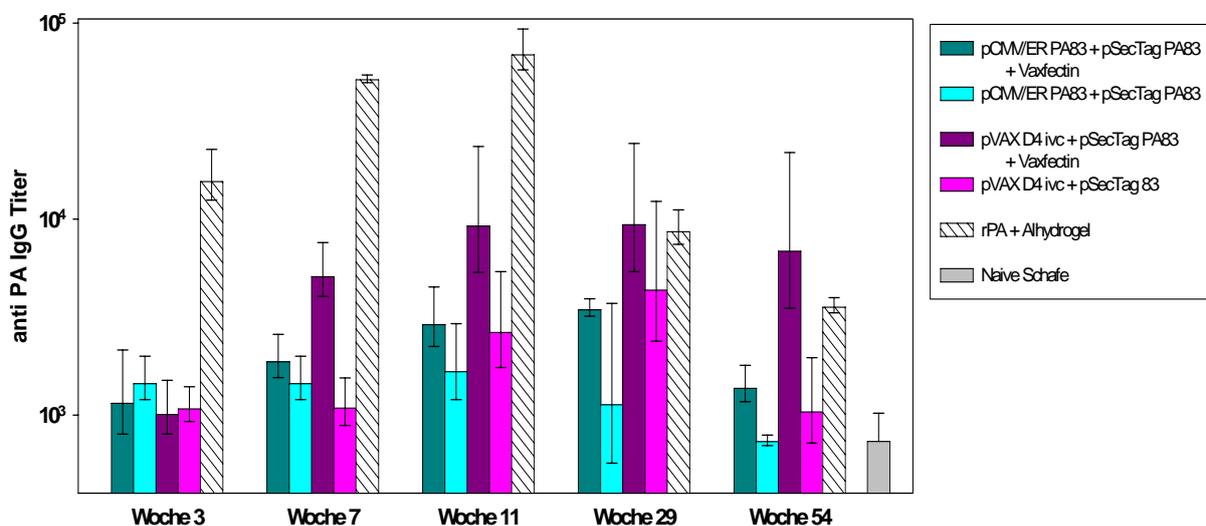


Abb. 37: AntiPA ELISA-Titer nach i. m. DNA-Immunisierung von Schafen

Die Säulen geben die geometrischen Mittelwerte von je 3 Tieren mit Standardabweichungen an. Die Endtiter der Einzeltiere wurden als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe ( $2^n$ ) mit einer  $OD_{414nm} \geq 0,1$  gemessen.

Zum gleichen Zeitpunkt wurde die Lymphozytenaktivität im Blut aller Tiere sowie von 3 naiven Tieren derselben Herde nach Stimulation *in vitro* mit rPA83 im Vergleich zur Stimulation mit dem Mitogen Concanavalin A (ConA) bestimmt. Abbildung 38 enthält die Meßwerte der Lymphozytenproliferation nach rPA83-Stimulation als Gruppenmittelwerte in Prozent zur Stimulation mit ConA. Während die IgG-Titer der Gruppen B, D und E ein Jahr nach der letzten Immunisierung auf die entsprechenden Werte nach der 1. Immunisierung zurückgegangen waren (Abb. 37), waren in allen Tieren antigenspezifisch stimulierbare Lymphozyten nachweisbar. Im Vergleich zur Negativkontrolle verhielten sich aufgrund der kleinen Gruppengröße und größerer Abweichungen je eines Tieres in den Gruppen B und D nur die mit pVAXivcPA83 immunisierten Gruppen C ( $p = 0,025$ ) und E ( $p = 0,011$ ) signifikant im t-Test.

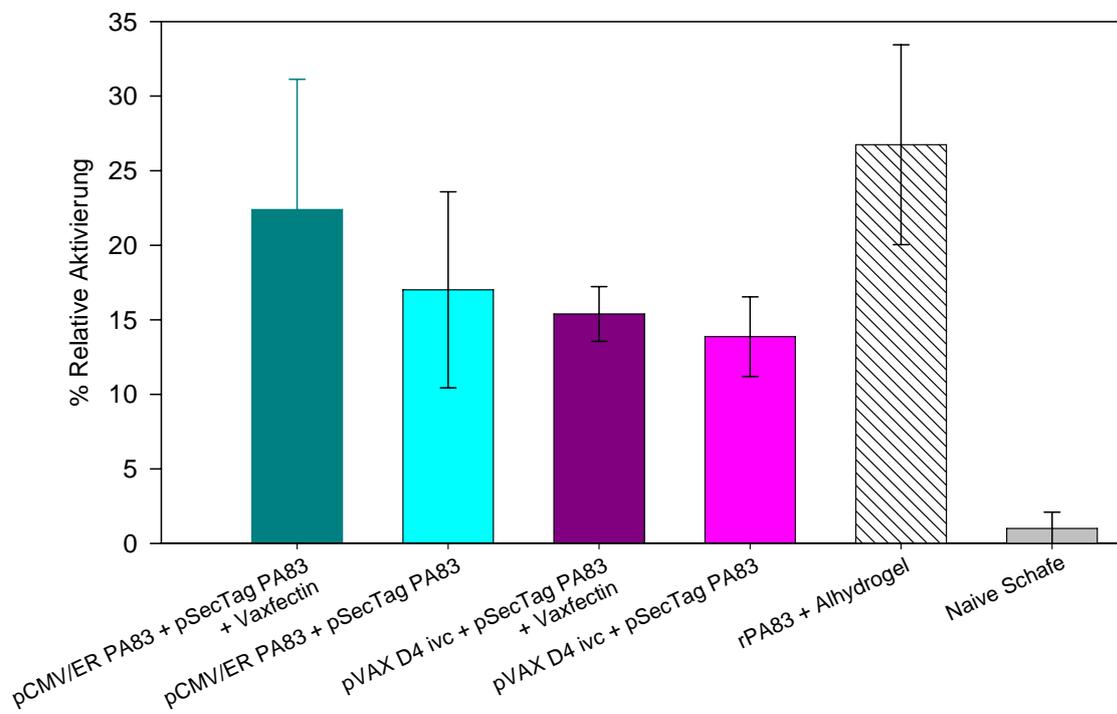


Abb. 38: PA spezifische Lymphozytenproliferation *in vitro*, 1 Jahr nach i. m. DNA-Immunisierung von Schafen. Die Säulen geben die Gruppenmittelwerte von je 3 Schafen in Bezug zur 100 % gesetzten maximalen Stimulation der Lymphozyten mit ConA an.

## **4.4 Immunantworten und Schutzraten im Mausmodell nach Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen**

### **4.4.1 Charakterisierung der Konstruktionen zur Expression von PA83 und PA63 im Impfstamm Zoosaloral H**

Nach der originären Klonierung des PA83ec-Gens aus dem Plasmid p19PA (R. Titball, DSTL, Porton Down, UK) mit den Regulationssignalen des Plasmids pQE30, wurden die zur Immunisierung von Mäusen verwendeten pro- und eukaryontischen Expressionskassetten für die Proteine PA83 und PA63 im Impfstamm Zoosaloral H kloniert. Die Konstruktionen mit dem prokaryontischen Plasmidvektor pVDL9.3 ermöglichen durch Fusion des Antigens mit der Signalsequenz aus dem hlyA-Gen des Hämolytins von *E. coli* sowie der Kombination mit den Genen B und D dieses Sekretionssystems den Export des rekombinanten Proteins in den periplasmatischen bzw. den extrazellulären Raum. Nach Überführung der vollständigen Exportkassette aus dem Plasmidvektor pVDL9.3 auf das Minitransposon miniTn5pUTKm und konjugativem Transfer dieses Vektors aus *E. coli* in Zoosaloral H wurden Exkonjuganten mit stabil in das Chromosom integrierten Exportkassetten für PA83ec isoliert. Durch Southern-Blotting der genomischen DNA und Hybridisierung mit markierten PA-DNA Fragmenten wurde die Integration von jeweils nur einer Kopie der Kassette in unterschiedliche, nicht näher bestimmte Positionen auf dem Chromosom bestätigt.

Zusätzlich zu den genannten Konstruktionen wurde im Vektorplasmid pVDL9.3 eine N-terminale translationale Fusion des PA63ec mit einem immunogenen Peptid aus dem Interleukin-1 $\beta$  (IL-1) Gen der Maus erstellt sowie im eukaryontischen Plasmidvektor pVAX die für die Funktion der Domäne 4 des PA wichtige Sequenz aus der AS-Schleife 4 $\beta$ 8 kloniert.

Die Konstruktionen aller Expressionskassetten sind ausführlich im Abschnitt Material und Methoden erklärt.

Jeweils mehrere Klone jeder Konstruktion wurden auf die Kriterien Reisolierbarkeit aus den Organen einer infizierten Maus, Stabilität der Expressionskassette nach Subkultivierung *in vitro* und Generationszeit der Bakterienkultur *in vitro* getestet.

#### 4.4.1.1 Prüfung der prokaryontischen Konstruktionen auf Expression und Sekretion von PA im Zoosaloral H

Die Abb. 39 demonstriert die Expression der rekombinanten Fusionsproteine für PA83ec und PA63ec nach plasmidaler oder chromosomaler Integration im Zoosaloral H.

Im Immunoblot wird die Größenzunahme durch die Fusion mit dem hlyA –Fragment sowohl für PA63ec als auch PA83ec im Vergleich zur Expressionskontrolle ohne Fusionspartner deutlich.

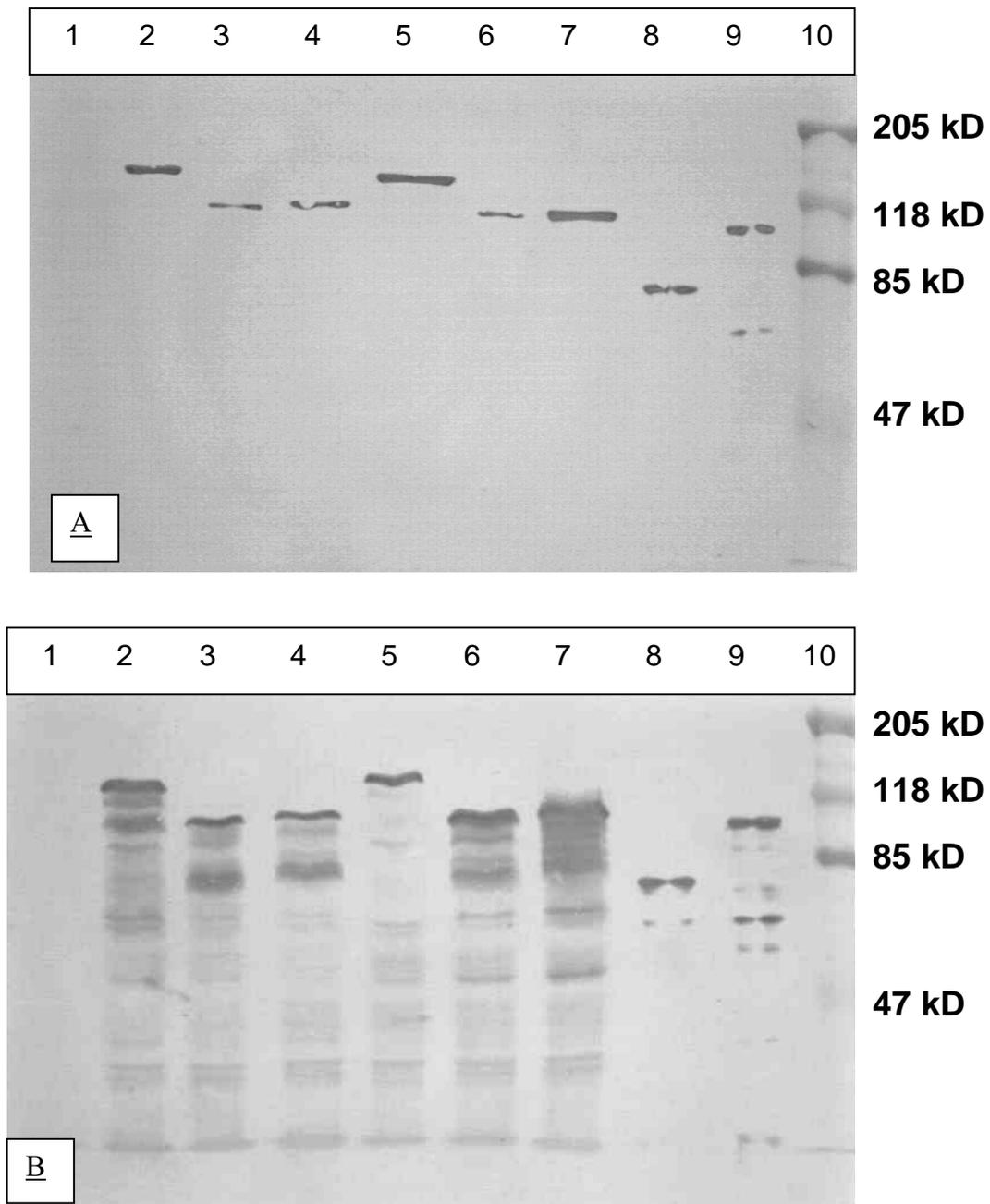


Abb. 39: Immunoblot der Proteine aus rekombinanten Salmonellen  
 A) Kochlysate aus dem Überstand von Übernachtskulturen (zweifach verdünnt),  
 B) Kochlysate aus dem Bakterienpellet von Übernachtskulturen (zweifach konzentriert)  
 Bahn 1: ZpVDL9.3 (negative Kontrolle), Bahn 2: ZpVDLPA83ec, Bahn 3: ZpVDLPA63ec,  
 Bahn 4: ZpVDLPA63ec-IL-1ec, Bahn 5: ZpuTKmPA83ec, Bahn 6: ZpuTKmPA63ec, Bahn  
 7: ZpuTKmPA63ec-IL-1ec, Bahn 8: rPA63ec, Bahn 9: rPA83ec, Bahn 10: molekularer  
 Größenmarker

#### 4.4.1.2 Nachweis der immunologischen Reaktivität der exprimierten Antigene mit humanen Seren

Für den Einsatz der Rekombinanten als Vakzine-Kandidaten war von besonderem Interesse, ob die exprimierten Fusionsproteine auch durch Antikörper aus einem nativen Serum erkannt werden. Für den Test wurde Serum einer mehrfach mit einer chemischen PA-Vakzine (AVA bzw. PA-UK) revakzinierten Person im Vergleich zum Serum einer nicht vakzinierten Person verwendet. Die Seren wurden in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt und reaktive Proteinbanden mit einem HRP konjugierten anti-human Ig mAk detektiert (Abb. 40).

Die rekombinanten Antigene reagierten positiv mit dem Impfs Serum und negativ mit einem Kontrollserum.

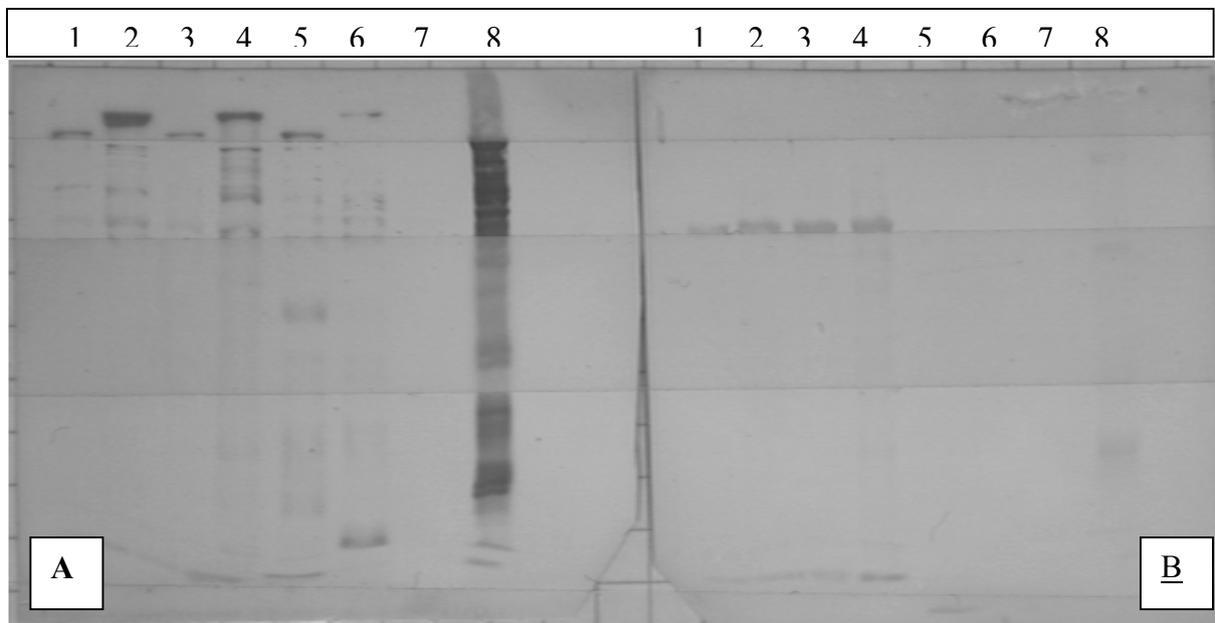


Abb. 40: Immunoblot von Lysaten rekombinanter Salmonellen mit (A) humanem Hyperimmunserum und (B) Serum einer nicht immunisierten Person  
Bahn1: ZpVDL9.3PA63ec; Bahn 2: ZpVDL9.3PA83ec; Bahn 3: ZpUTKmPA63ec; Bahn 4: ZpUTKmPA83ec; Bahn 5: pQE30PA63ec in *E. coli*; Bahn 6: pQE30PA83ec in *E. coli*; Bahn 7: pVDL9.3 in *E. coli* (Negativkontrolle); Bahn 8: pQE30PA83 in *E. coli* (Positivkontrolle)

#### 4.4.1.3 Stabilitätstest für Expressionskassetten auf pro- und eukaryontischen Plasmiden

Für die auf Plasmiden vorliegenden pro- und eukaryontischen Expressionskassetten in aus Mäusen reisolierten rekombinanten Salmonellen wurde für jeweils mehrere Isolate die Stabilität durch Subkultivierung *in vitro* ohne Antibiotika-Zusatz geprüft. Die Subkultivierung erfolgte 2x täglich durch Übertragung von 100 µl Kultur in 10 ml frische, vorgewärmte

Standard I-Bouillon und Inkubation bei 37 °C unter Schütteln. Aus jeder Subkultur wurden 5 Verdünnungsstufen auf Agarplatten mit und ohne Antibiotika ausplattiert und die Anzahl der KBE verglichen. Für die auf dem Vektor pVDL9.3 kodierten Kassetten war der Plasmidverlust verschiedener Isolate nach 7 Inkubationen mit 3-93 % sehr unterschiedlich. Reisolat mit einer Plasmidstabilität von mehr als 97 % nach 7 Subkultivierungen wurden für die Immunisierungsversuche verwendet. Für die eukaryontischen Expressionskassetten wurde der in Tab. 7 aufgeführte Verlauf der Plasmidverluste gemessen. Mit Ausnahme der Expressionskassette pVAX4ß8, für die auch nach 7 Passagen keine Unterschiede in der Anzahl der KBE auf Platten mit und ohne Ap auftraten, waren die Plasmidverluste für alle anderen Konstruktionen sehr variabel. Plasmide vom Typ pCMV/myc/ER verhielten sich besonders instabil. Auch hier wurden die Reisolat mit der höchsten Plasmidstabilität weiterverwendet.

Tab. 7: Plasmidstabilität für eukaryontische Expressionskassetten im Zoosaloral H in vitro

	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5	Passage 6	Passage 7
ZpcDNA4 PA83 /1	83,44%	60,68%	78,37%	59,00%	75,04%	62,34%	54,70%
ZpcDNA4 PA83 /2	122,52%	76,90%	86,85%	61,30%	58,94%	58,84%	67,05%
ZpcDNA4 PA63 /1	90,39%	79,13%	81,91%	66,88%	68,12%	73,07%	63,26%
ZpcDNA4 PA63 /2	115,51%	94,47%	87,09%	30,73%	22,39%	18,11%	16,61%
ZpsecTag PA83	65,23%	89,73%	70,49%	70,42%	59,00%	57,05%	56,44%
ZpsecTag 4ß8	115,97%	78,44%	93,96%	62,43%	59,33%	54,71%	59,15%
ZpCMV/ER PA63	4,50%	0,50%	0,40%	<0,1%	<0,05%	<0,01%	<0,005%
ZpCMV/ER PA83	74,70%	51,70%	7%	4%	0,60%	1%	0,30%
ZpVAX PA63	114,50%	123,50%	114%	88,30%	85,50%	69,50%	66,45%
ZpVAX PA83	83,50%	98%	88,50%	103%	70,50%	67%	59%

#### 4.4.1.4 Bestimmung der Generationszeiten rekombinanter *Salmonella*-Klone *in vitro*

Die als Generationszeit bezeichnete Zeitdauer, die eine Kultur während der logarithmischen Wachstumsphase zur Verdopplung der Bakterienzahl benötigt, wurde als Kriterium für den Einfluß der Klonierung der rekombinanten Expressionskassetten auf die Vitalität ihres Trägers verwendet. Während der logarithmischen Wachstumsphase kann die optische Dichte einer Kultur ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) als Korrelat für die Bakterienzahl genutzt werden. Unterschiede zwischen den Klonen waren insbesondere nach der chromosomalen Integration zu erwarten. Nach Mitov et al. (1992) kann die Generationszeit als ein Marker für die Attenuierung eines genetisch manipulierten Bakteriums dienen.

Die Abbildung 41 zeigt exemplarisch die Wachstumskurven von plasmidial und chromosomal kodierten prokaryontischen Expressionskassetten für PA63ec und PA83ec. Die zugehörigen Generationszeiten sind in Tabelle 8 gelistet. Klone mit ähnlich langer Generationszeit wie für den Elternstamm Zoosaloral H wurden weiter verwendet.

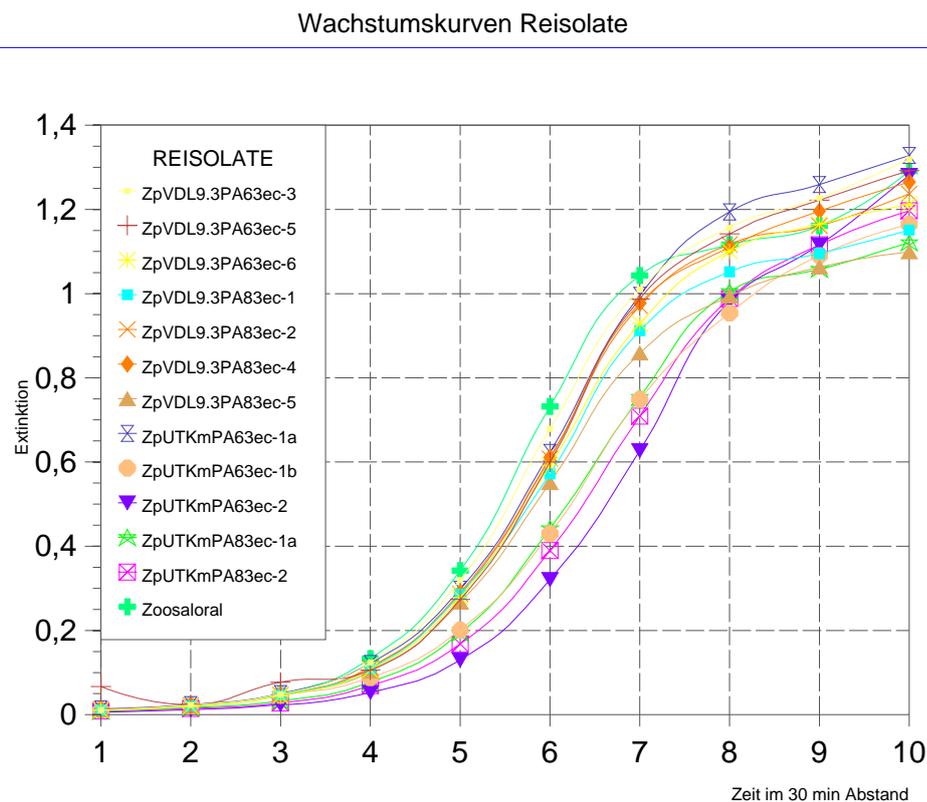


Abb. 41: Wachstumskurven zur Bestimmung der Generationszeit rekombinanter *Salmonellen in vitro*

Tab. 8: Generationszeiten für Reisolate rekombinanter Salmonellen *in vitro*

<b>Stamm</b>	<b>Generationszeit</b>
Zoosaloral	30 min
RI: ZpVDL PA63ec-3	31.5 min
RI: ZpVDL PA63ec-5	30 min
RI: ZpVDL PA63ec-6	33 min
RI: ZpVDL PA83ec-1	34.4 min
RI: ZpVDL PA83ec-2	30 min
RI: ZpVDL PA83ec-4	31.4 min
RI: ZpVDL PA83ec-5	35.5 min
RI: ZpUTKmPA63ec-1a	32.1 min
RI: ZpUTKmPA63ec-1b	40 min
RI: ZpUTKmPA63ec-2	33 min
RI: ZpUTKmPA83ec-1a	38 min
RI: ZpUTKmPA83ec-2	37.3 min

#### **4.4.2 Orale Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit prokaryontischen und eukaryontischen PA exprimierenden Konstruktionen im Zoosaloral H**

In den Vorversuchen zum Screening von rekombinanten Salmonellen als Vakzinekandidaten auf Immunogenität wurde das international für Immunisierungsversuche mit Salmonellen präferierte Balb/c-Mausmodell verwendet. Die Gruppen bestanden aus 5-7 weiblichen Mäusen im Alter von 6-8 Wochen. Die Impfung erfolgte dreimal, im Abstand von 5 Tagen nach der 1. und 21-27 Tagen nach der 2. Immunisierung, oral per Knopfkanüle mit einer frisch vorbereiteten Salmonellen-Suspension in PBS mit Bicarbonat (siehe Kap. 2.10.1). Die eingesetzten Konstruktionen sowie die verimpfte Dosis enthält Tab. 9.

Im Abstand von 48-52 Tagen nach der 3. Immunisierung wurden die Tiere getötet und die im nachfolgenden aufgeführten immunologischen Parameter bestimmt.

Tab. 9: Orale Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit rekombinanten Salmonellen

<b>Gruppe</b>	<b>Konstruktion</b>	<b>KBE der Impfsuspension</b>
A	ZpVDL PA63ec	7,2-8,5 x 10 <sup>8</sup>
B	ZpVDL PA83ec	0,65-1,7 x 10 <sup>9</sup>
C	ZpUTKm PA63ec	0,72-1,7 x 10 <sup>9</sup>
D	ZpUTKm PA83ec	0,73-1,7 x 10 <sup>9</sup>
E	ZpVDL PA63ecIL-1ec	0,78-1,3 x 10 <sup>9</sup>
F	ZpCMV/ER PA83	0,64-1,0 x 10 <sup>9</sup>

Tab. 9: Orale Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit rekombinanten Salmonellen (Fortsetz.)

G	ZpCMV/ER PA63	$0,99-1,3 \times 10^9$
H	ZpVAX 4ß8	$3,3-7,5 \times 10^8$
J	ZpsecTag PA83	$0,68-1,3 \times 10^9$
K	pVAXPA83	$7,4-9,1 \times 10^8$
L	pVAXPA63	$0,52-1,1 \times 10^9$
M	ZpUTKmPA63ec-IL1ec	$6,7-8,3 \times 10^8$
N	ZpVDL9.3 negativ	$1,6 \times 10^9$

Die getesteten Konstruktionen induzierten nach oraler Immunisierung von Balb/c-Mäusen sehr unterschiedliche Immunantworten (Abbildungen 42-45). Hervorstechendes Merkmal aller Reaktionen war der starke Anteil der Th1 basierten Immunantwort, bei der die IgG-Subklasse 2a und IFN $\gamma$  dominiert. IgG1 und IL-4 oder IL-5 waren dagegen kaum nachweisbar.

Die stärksten Immunreaktionen in Bezug auf antiPA spezifische Antikörper und IFN $\gamma$ -Bildung wurden nach Immunisierung mit prokaryontischen Expressionskassetten durch das plasmidal (Gruppe B) und chromosomal integrierte (Gruppe D) Fusionsprotein PA83ec- $\gamma$ HlyA erzeugt. Dabei reagierten 5 von 6 Tieren der Gruppe B mit antiPA-IgG2a und 6 von 6 Tieren mit den höchsten im Versuch gemessenen IFN $\gamma$ -Werten. Letztere sind gegenüber der Negativgruppe hoch signifikant ( $p < 0,001$ , Student t-Test; Abb. 44). In Gruppe D reagierten 2 von 5 Tieren mit antiPA gesamtIg oder IgG2a (Abb. 42) und 4 von 6 Tieren mit gegenüber der Negativkontrolle signifikant erhöhten IFN $\gamma$ -Werten ( $p < 0,05$ , Student t-Test; Abb. 44).

Sowohl plasmidal wie chromosomal integrierte prokaryontische Expressionskassetten, die für das Fusionsprotein PA63ec- $\gamma$ HlyA kodierten, induzierten keine bzw. nur in wenigen Einzeltieren eine antiPA spezifische Antikörperantwort (Abb. 42). Allerdings reagierten alle diese Gruppen (A, C, E und M) mit einer PA spezifischen Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion bei unterschiedlich vielen Einzeltieren (Abb. 44). Signifikant höher als in der Negativkontrolle war die IFN $\gamma$ -Bildung im Gruppenmittel jedoch nur für die Fusion aus PA63ec und dem immunogenen Peptid von IL-1 ( $p < 0,05$ ), der Wert für die Gruppe C (ZpUTKmPA63ec) lag bei  $p = 0,05$  (Student t-Test).

In den Gruppen, die Salmonellen mit eukaryontischen Expressionskassetten erhalten hatten, wurden antiPA spezifische gesamt Ig nach Immunisierung mit dem Plasmid pVAXPA83 (in 5 von 7 Tieren) und pVAXPA63 (in 6 von 7 Tieren) gebildet (Abb. 43). Diese wurden als IgG2b und IgG3 Ak identifiziert (Daten nicht gezeigt).

Nach Immunisierung mit den Konstruktionen ZpCMV/ER PA63 (Gruppe G), ZpSecTag PA83 (Gruppe J) und ZpVAX4ß8 waren keine antiPA Ak nachweisbar und die für diese

Gruppen bestimmten  $\text{IFN}\gamma$ -Werte waren nicht signifikant höher als jene der Negativkontrollgruppe (Abb. 45).

Die Tiere der Gruppe F (pCMV/ER PA83) reagierten einheitlich mit einer hohen  $\text{IFN}\gamma$ -Bildung nach Restimulation *in vitro* ( $p < 0,05$ , Student t-Test), während gleichzeitig nur 1 Tier einen nachweisbaren antiPA-Titer hatte (Abb. 45 und Abb. 43).

Zum Nachweis der stattgefundenen Immunisierung mittels Salmonellen wurde für jedes Tier der anti *Salmonella* spezifische Ak-Titer bestimmt. In Abb. 46 sind die Gruppenmittelwerte dargestellt. Die Höhe dieser ELISA-Titer korreliert nicht mit den antiPA spezifischen Titern.

Für die Auswahl der erfolgversprechendsten Salmonella-Vakzinekandidaten wurden beide Parameter, sowohl die Induktion von Antikörpern als auch die Bildung von  $\text{IFN}\gamma$ , herangezogen und damit die Anzahl der Reagenten in jeder Versuchsgruppe bestimmt. Die zusammengefaßten Daten sind aus der Tabelle 10 zu entnehmen.

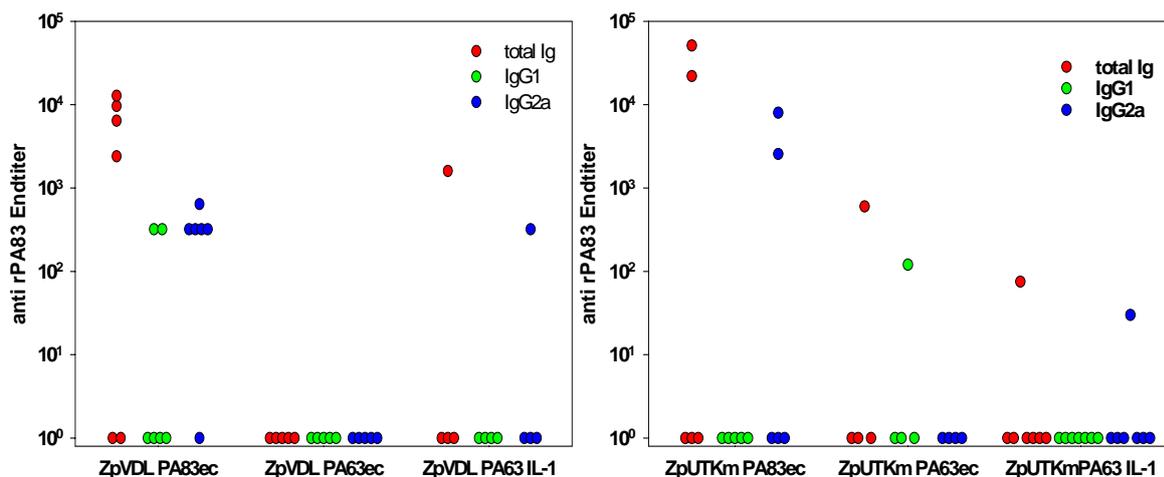


Abb. 42: Anti-rPA83 Endtiter von Balb/c-Mäusen nach oraler Immunisierung mit prokaryontischen Expressionskassetten im Zoosalaral H

Der Endtiter wurde bestimmt als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe ( $2^n$ ), deren  $\text{OD}_{414\text{nm}}$ -Wert größer war als der Mittelwert für die entsprechende Verdünnungsstufe der Negativkontrolle, plus 0,1.

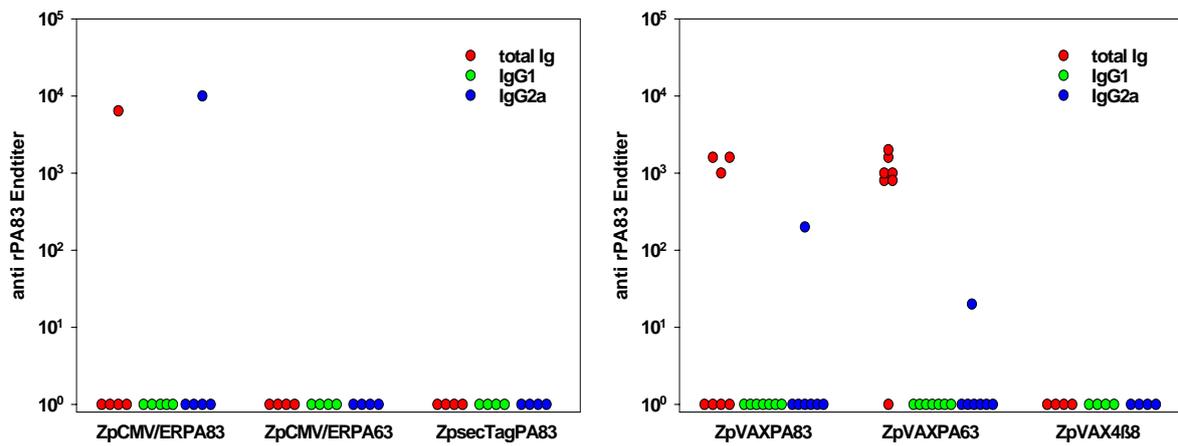


Abb. 43: anti-rPA83 Endtiter von Balb/c-Mäusen nach oraler Immunisierung mit eukaryontischen Expressionskassetten in Zoosaloral H  
 Der Endtiter wurde bestimmt als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe ( $2^n$ ), deren  $OD_{414nm}$ -Wert größer war als der Mittelwert für die entsprechende Verdünnungsstufe der Negativkontrolle, plus 0,1.

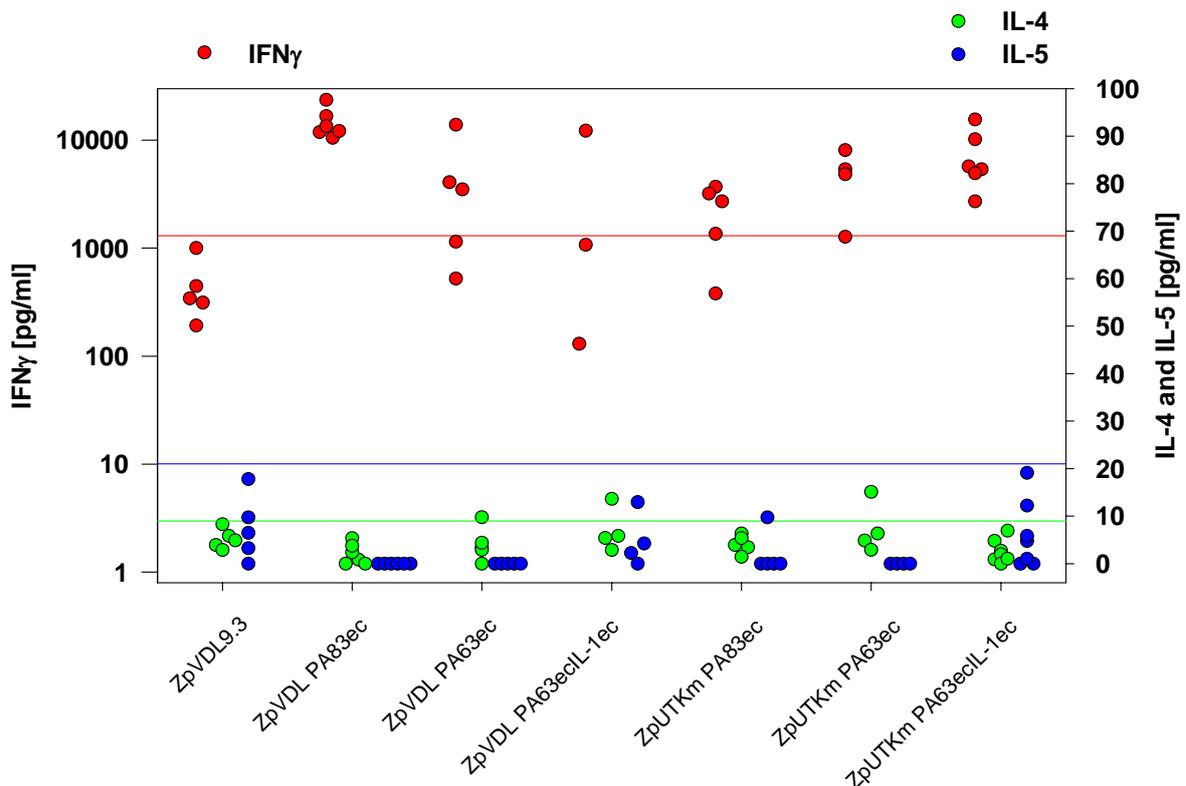


Abb. 44: Zytokinwerte nach Stimulation von Milzzellen mit rPA83 nach 60 h in vitro. Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen mit prokaryontischen Expressionskassetten. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Mittelwert der N-Gruppe ZpVDL9.3 plus 2 x SD für jedes Zytokin. Die angegebenen Einzelwerte ergeben sich aus den Meßwerten der stimulierten Zellen abzüglich der Werte für die nichtstimulierten Zellen des gleichen Tieres.

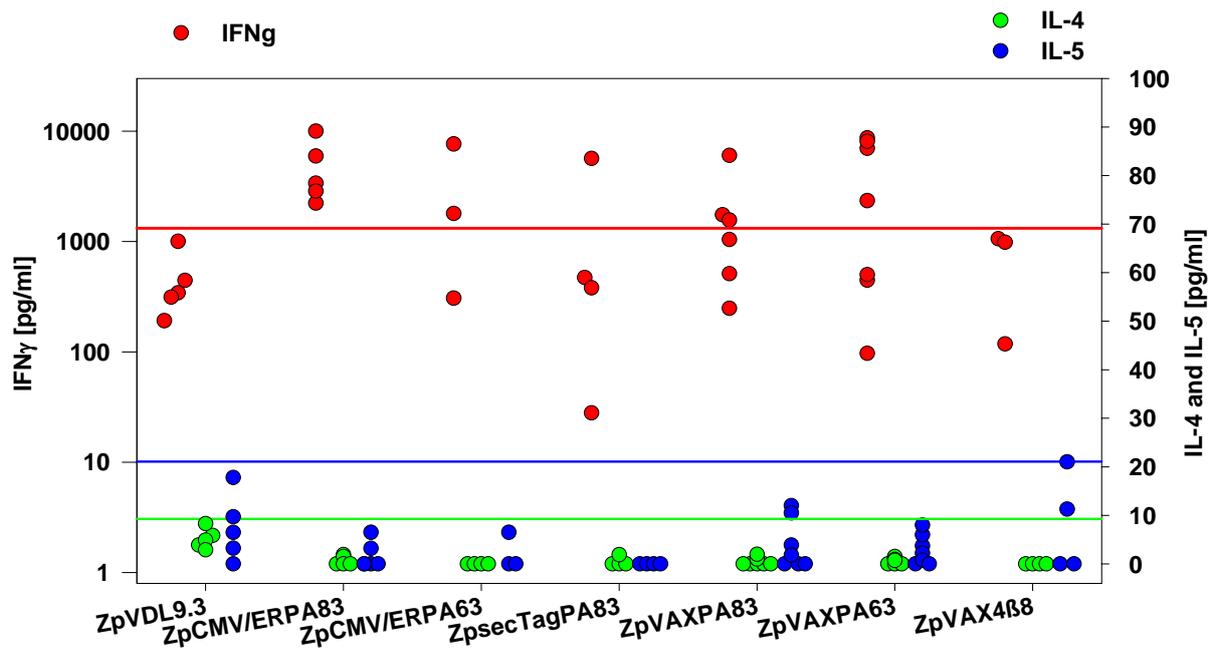


Abb. 45: Zytokinwerte nach Stimulation von Milzzellen mit rPA83, nach 60 h, *in vitro*. Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen mit eukaryontischen Expressionskassetten. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Mittelwert der N-Gruppe ZpVVDL9.3 plus 2 x SD für jedes Zytokin. Die angegebenen Einzelwerte ergeben sich aus den Meßwerten der stimulierten Zellen abzüglich der Werte für die nichtstimulierten Zellen des gleichen Tieres.

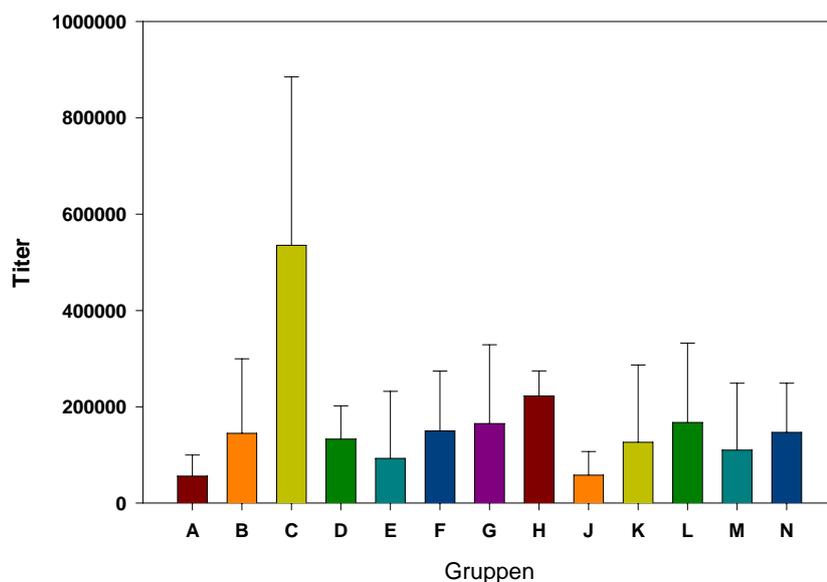


Abb. 46: Anti-Salmonella gesamt Ig von Balb/c-Mäusen nach oraler Immunisierung Mittelwerte aller Gruppen mit Standardfehler

Tabelle 10: Reagenten pro Gruppe nach oraler Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen im Balb/c-Mausmodell

Gruppe	Konstruktion	Anzahl Mäuse, die anti-PA Ak bilden/Zahl der getesteten Tiere	Anzahl Mäuse, die PA spezifisches IFN $\gamma$ bilden/Zahl der getesteten Tiere	Gesamtzahl der Reagenten/Zahl der getesteten Tiere
A	ZpVDLPA63ec	0/5	3/5	3/5
<b>B</b>	<b>ZpVDLPA83ec</b>	<b>5/6</b>	<b>6/6</b>	<b>6/6</b>
C	ZpUTKmPA63ec	1/4	4/4	4/4
<b>D</b>	<b>ZpUTKmPA83ec</b>	<b>2/5</b>	<b>4/5</b>	<b>4/5</b>
E	ZpVDLPA63ec-IL1ec	1/4	1/4	1/4
F	ZpCMV/ER PA83	1/5	5/5	5/5
G	ZpCMV/ER PA63	0/5	3/5	3/5
H	ZpVax4B8	0/5	2/5 (schwach)	2/5
J	ZpsecTagPA83	0/4	3/4	3/4
<b>K</b>	<b>ZpVaxPA83</b>	<b>5/7</b>	<b>6/7</b>	<b>6/7</b>
<b>L</b>	<b>ZpVaxPA63</b>	<b>6/7</b>	<b>6/7</b>	<b>6/7</b>
M	ZpUTKmPA63ec-IL1ec	1/7	6/7	6/7

#### 4.4.3 Orale Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen und Belastungsinfektion mit Lebendsporen vom Stamm STI im A/J-Mausmodell

Nach Auswertung der bakteriologischen und immunologischen Daten aus der Immunisierung von Balb/c-Mäusen wurden für die Folgeversuche die prokaryontischen Konstruktionen pVDL PA83ec und pUTKm PA83ec sowie die eukaryontische Konstruktion pVAX PA63 im Zoosaloral H als Vakzinekandidaten ausgewählt. Da in publizierten Studien mit auf verschiedene Art und Weise attenuierten *Salmonella* Serovaren der Einfluß des genetischen Hintergrunds auf die Immunogenität des Wirtsstammes sowie die darin exprimierten Fremddantigene belegt waren, wurde für die weiteren Versuche zusätzlich der Typhimurium – Impfstamm SL3264  $\Delta$ aroA (Hoiseh und Stocker, 1981) mit der plasmidkodierte Expressionskassette pVDL9.3PA83ec in die Untersuchung einbezogen.

Weibliche A/J-Mäuse im Alter von 7-9 Wochen wurden dreimal im Rhythmus 0-6-33 Tage oral mittels Knopfkanüle mit den folgenden Konstruktionen immunisiert:

Gruppe B: ZpVDL PA83ec (plasmidkodierte PA83ec- $\gamma$ HlyA im Zoosaloral H),

Gruppe D: ZpUTKm PA83ec (chromosomal kodierte PA83ec- $\gamma$ HlyA im Zoosaloral H),

Gruppe L: ZpVAX PA63 (plasmidkodierte PA63, eukaryontische Expressionskassette im Zoosaloral H,

Gruppe O: SLpVDL PA83ec (plasmidkodierte PA83ec- $\gamma$ HlyA im SL3262).

Die Belastungsinfektion erfolgte mit  $2.5 \times 10^5$  Sporen vom Stamm STI in  $100 \mu\text{l}$  physiologischer Kochsalzlösung, i. p., 17 Tage nach der letzten Immunisierung.

Antikörpertiter wurden 16 Tage nach der letzten Immunisierung bestimmt (Abb. 47). Die Einzeltierwerte zeigen auch für das A/J-Mausmodell eine hohe Heterogenität der Immunantworten innerhalb einer Tiergruppe. In den 4 Versuchsgruppen reagierten 4 von 7 (Gruppe B), 3 von 8 (Gruppe D), 4 von 12 (Gruppe L) und 5 von 11 Tieren (Gruppe O) mit der Bildung von antiPA spezifischen Antikörpern. Von den 42 % serokonvertierten Reagenten überlebten 4 (25 %) die Infektion, das entsprach 10,5 % aller Tiere im Versuch. Je 2 überlebende Tiere waren mit den Konstruktionen ZpVDL PA83ec oder ZpUTKm PA83ec im Zoosalaral H immunisiert worden. Drei weitere Tiere dieser Gruppen mit antiPA-Titern von 400 bis 25.000 verstarben innerhalb von 3-5 Tagen. Eine Korrelation zwischen antiPA-Ak und Überleben war nicht vorhanden.

Die mit pVDLPA83ec im SL3262 oder mit ZpVAX PA63 immunisierten Tiere verstarben zu 100 %.

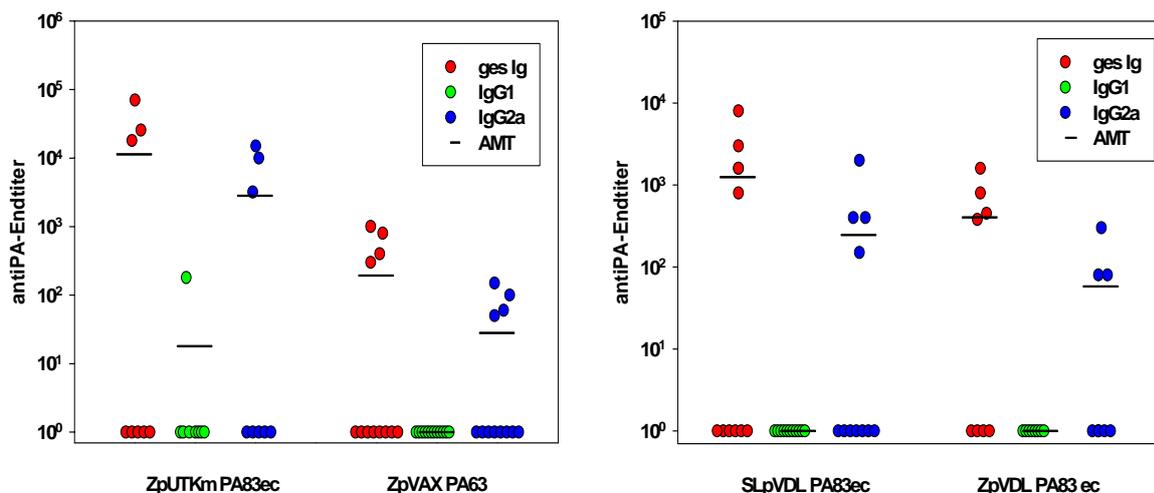


Abb. 47: Anti-PA Endtiter von A/J-Mäusen nach oraler Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen

Der Endtiter wurde bestimmt als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe ( $2^n$ ), deren  $OD_{414\text{nm}}$ -Wert größer war als der Mittelwert für die entsprechende Verdünnungsstufe der Negativkontrolle, plus 0,1.

In einer Versuchswiederholung, bei der die Tiere viermal immunisiert und danach mit einer 4fach höheren Infektionsdosis belastet wurden, wurden nur die als partiell protektiv getesteten Konstruktionen ZpVDL PA83ec und ZpUTKm PA83ec weiter verwendet.

Je 20 weibliche A/J-Mäuse im Alter von 10-12 Wochen wurden 4 Mal im Rhythmus von 0-5-27-48 Tagen immunisiert. Für die 4. Immunisierung wurde die Dosis von ca.  $9 \times 10^8$  auf 3 bis

$7 \times 10^9$  Salmonellen erhöht. In Abänderung der ursprünglichen Anzucht der Impfkultur in Standard I-Bouillon wurde in diesem Versuch LB-Medium mit 0.3 M NaCl verwendet. Die Impfsuspension wurde den Tieren mit Hilfe einer Laborpipette in das Maul gegeben und dann das Abschlucken der Suspension abgewartet.

Die Serumkontrolle erfolgte 2 Wochen nach der 4. Immunisierung. 17 Tage nach der letzten Immunisierung wurden  $1.5 \times 10^6$  STI Lebendsporen, i. p., als Belastungsinfektion appliziert.

In diesem Versuch reagierten in der Gruppe ZpVDL PA83ec 7 von 20, in der Gruppe ZpUTKm PA83ec 9 von 20 Tieren mit antiPA-Ak auf die Immunisierung (Abb. 48). Von diesen 16 serokonvertierten Tieren überlebten 7 (44 %) die Belastungsinfektion mit  $1.5 \times 10^6$  Sporen vom Stamm STI. Das entsprach 27,5 % aller Tiere im Versuch. Weitere 3 Tiere hatten eine verlängerte Lebenszeit (Abb. 49). Drei Tiere, die vor der Belastungsinfektion keinen antiPA-Titer aufwiesen, überlebten ebenfalls (Abb. 50, Tab. 11). Mäuse der zugehörigen Negativgruppe waren bei einer Belastung mit  $2.8 \times 10^5$  Sporen nach spätestens 5 Tagen verstorben (Abb. 49). Das Überleben beider Versuchsgruppen war signifikant besser als das der Negativgruppe ( $p = 0.0009411$ , log rank test). Zwischen den Versuchsgruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

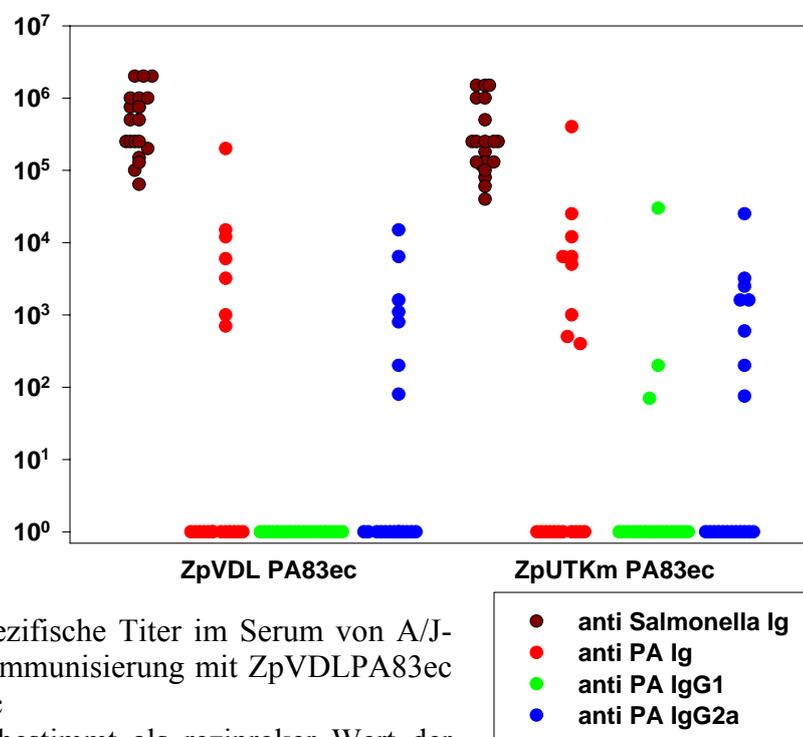


Abb. 48: Antigen spezifische Titer im Serum von A/J-Mäusen nach oraler Immunisierung mit ZpVDLPA83ec und ZpUTKmPA83ec

Der Endtiter wurde bestimmt als reziproker Wert der letzten Verdünnungsstufe ( $2^n$ ), deren  $OD_{414nm}$ -Wert größer war als der Mittelwert für die entsprechende Verdünnungsstufe der Negativkontrolle, plus 0,1.

Mit Ausnahme eines Tieres nach Immunisierung mit ZpUTKm PA83ec hatte keine Maus vor der Belastungsinfektion einen Neutralisationstiter von  $> 50$ . Auch nach der Infektion mit Lebendsporen vom Stamm STI variierten die  $NT_{50}$  der überlebenden Tiere um 2 Zehnerpotenzen.

In Tab. 11 wurden alle immunologischen Daten des Versuchs in Relation zum Verlauf der Belastungsinfektion zusammengefasst. Daraus wird die enorme Heterogenität der individuellen Reaktion von A/J-Mäusen auf die Immunisierung mit *Salmonella*-Lebendvektoren sowie die fehlende Korrelation zwischen antiPA-Ak vor der Infektion und dem Ausgang der Belastungsinfektion deutlich.

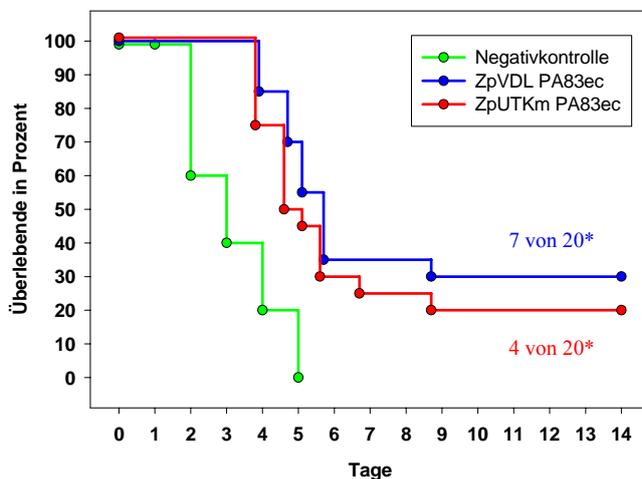


Abb. 49: Überleben von A/J-Mäusen nach einer Belastungsinfektion mit  $1.5 \times 10^6$  STI Lebendsporen, nach Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen  
\* $p=0,0009411$ , log rank test, im Vergleich zur Negativkontrolle

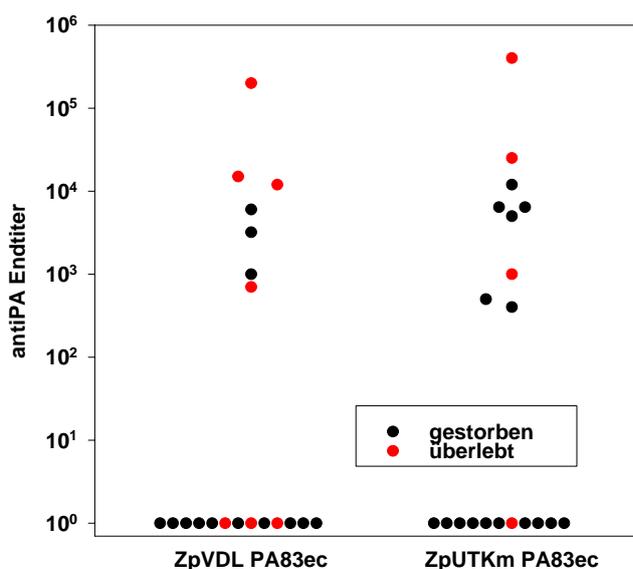


Abb. 50: Überleben von A/J-Mäusen in Relation zu antiPA-gesamtIg Titern vor der Belastungsinfektion

Parallel zu den hier beschriebenen Versuchen wurde mit der Konstruktion ZpUTKm PA83ec ein Immunisierungsversuch in A/J-Mäusen am Dstl Porton Down, in der Arbeitsgruppe von R. Titball durchgeführt (Garmory et al., 2003). Nach oraler Immunisierung bestätigten sich auch in diesem Versuch die heterogenen und niedrigen antiPA-Titer. Im Gegensatz dazu reagierten alle Tiere einer Gruppe auf die dreimalige intravenöse Applikation von  $10^5$  Salmonellen, im Abstand von 2 Wochen, mit hohen antiPA-Antikörperantworten, die sowohl aus Ak der Subklasse IgG1 als auch aus IgG2a bestanden. Die Belastungsinfektion mit  $10^5$  Sporen vom Stamm STI, i. p., überlebten 4 von 5 Tieren, die Infektion mit  $10^6$  Sporen ( $1000 \times LD_{50}$ , nach Angaben der Autoren) überlebten 5 von 5 Tieren über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen.

Tab. 11 Immunisierung mit PA exprimierenden Salmonellen und Belastungsinfektion mit Lebendsporen vom Stamm STI im A/J-Mausmodell

**Gruppe ZpUTKm PA83ec**

<b>Mause</b>	<b>Tod ind Tagen p. c.*</b>	<b>antiPA-Ig Titer a. c.**</b>	<b>antiSalmo Titer a. c.**</b>	<b>antiPA NT50 a. c.**</b>	<b>antiPA-Ig Titer p. c.*</b>	<b>antiPA NT50 p. c.*</b>
1		25.000	1.000.000	<50	>>1.000.000	3.500
2		-	130.000	<50	>>1.000.000	>6.400
3		1.000	1.500.000	<50	>1.000.000	>6.400
4		400.000	1.000.000	3.500	>>1.000.000	>6.400
5	5.7	5.000	250.000	<50		
6	3.9	-	80.000			
7	4.7	-	250.000			
8	5.7	-	180.000			
9	4.7	-	120.000			
10	3.9	12.000	130.000	<50		
11	3.9	-	40.000			
12	3.9	500	1.500.000	<50		
13	5.1	-	500.000			
14	3.9	-	250.000			
15	6.7	6.400	250.000	<50		
16	4.7	400	60.000	<50		
17	5.7	-	250.000			
18	8.7	-	130.000			
19	4.7	-	100.000			
20	4.7	6.400	1.500.000	<50		

Tab. 11 Immunisierung mit PA exprimierenden Salmonellen und Belastungsinfektion mit Lebendsporen vom Stamm STI im A/J-Mausmodell (Fortsetzg.)

Gruppe ZpVDL PA83ec \* p. c. (post challenge)  
 \*\* a. c. (ante challenge)

Mause	Tod in Tagen p. c.*	antiPA-Ig Titer a. c.**	antiSalmo Titer a. c.**	antiPA NT50 a. c.**	antiPA-Ig Titer p. c.*	antiPA NT50 p. c.*
1		-	750.000	<50	>>1.000.000	6.000
2		-	>2.000.000	<50	500.000	5.000
3		200.000	>2.000.000	<50	256.000	>6.400
4		700	500.000	<50	700.000	<50
5		15.000	1.000.000	<50	1.000.000	400
6		12.000	>>2.000.000	<50	>>1.000.000	400
7		-	250.000	<50	2.000	50
8	8.7	3.200	1.000.000	<50		
9	5.1	1.000	150.000	<50		
10	5.1	-	500.000			
11	5.7	-	250.000			
12	5.1	6.000	1.000.000	<50		
13	4.7	-	200.000			
14	4.7	-	64.000			
15	3.9	-	250.000			
16	5.7	-	100.000			
17	3.9	-	750.000			
18	4.7	-	250.000			
19	3.9	-	128.000			
20	5.7	-	750.000			

## 5. Diskussion und Bewertung

### Auswahl und Optimierung von Tiermodellen für Infektionsversuche mit Lebendsporen von *B. anthracis*

Neuere publizierte Arbeiten für die Testung von Vakzinekandidaten gegen eine Infektion mit *B. anthracis* in der Maus präferieren ein Belastungs-Modell, bei dem der Maus-Stamm A/J mit definierten Sporenmengen eines für den Menschen avirulenten Vakzinestammes von *B. anthracis* (STI), i. p., belastet wird. Diese Daten zeigen, daß mit avirulenten Sporen (Tox<sup>+</sup>, Cap<sup>-</sup>) eine dosisabhängige Letalitätsrate in A/J-Mäusen zu erzielen ist, bzw. diese Mäuse durch entsprechende Immunisierung gegen eine mehr als 1000fache LD<sub>50</sub> der Sporen eines nicht kapselbildenden aber toxigenen Stammes von *B. anthracis*, STI, geschützt werden können (Beedham et al., 2001). Eigene Erfahrungen mit diesem Belastungsmodell machten jedoch deutlich, daß die Herstellung des jeweils verwendeten Sporenmaterials von erheblichem Einfluß auf den Ausgang der Infektion ist und daher die publizierten Daten zur LD<sub>50</sub> von STI-Sporen für die A/J-Maus nicht kritiklos übernommen werden können. Vielmehr war die Bestimmung der tatsächlichen LD<sub>50</sub> und damit der erreichbaren Schutzwirkung unter den Bedingungen im eigenen Labor notwendig. Während die publizierten Daten auf einer laboreigenen Sporenpräparation beruhten, wurde in den hier beschriebenen Versuchen eine Original-Ampulle des russischen Impfstammes (STI) verwendet. Die Bestimmung der LD<sub>50</sub> für dieses Material ergab nach i. p. Applikation mit  $1,4 \times 10^4$  Sporen einen 10fach höheren Wert als bei Beedham et al. (2001).

Die in den orientierenden Vorversuchen eingesetzten Mäuse-Inzuchtlinien entsprechen den in der internationalen Literatur verwendeten Mausmodellen für entweder die Prüfung von Vakzinekandidaten in der Belastungsinfektion mit Sporen von *B. anthracis* (A/J-Maus) oder für die Prüfung von rekombinanten Salmonellen als Vakzinekandidaten (Balb/c-Maus). Die Nutzung derartig genetisch einheitlicher Versuchstiere ist international üblich und im Stadium der Prüfung der immunogenen Eigenschaften von Vakzinekandidaten auch sinnvoll. Für die Prüfung der Protektivität von Vakzinen sollten Daten von nicht immundefekten Probanden jedoch aussagekräftiger sein. Publizierte Infektions-Versuche von A/J-Mäusen mit vollvirulenten Ames-Sporen erzielten abhängig von der Art der Immunisierung gar keinen Schutz (Humanvakzine AVA oder rPA mit Alhydrogel) oder nur geringe Schutzraten von bis zu 36 % (rPA mit RIBI-Adjuvans). Etwas höhere Schutzraten (67 %) waren nach Immunisierung mit bis zu  $10^8$  Lebend-Sporen eines avirulenten *B. anthracis* (aroA) erzielt worden (Ivins et al., 1990). Etwas resistenter gegenüber der Infektion mit vollvirulenten Sporen sind CBA/J-Mäuse. In Infektions-Versuchen mit Ames Sporen waren abhängig von

der Immunisierung Schutzraten von 0-10 % (Humanvakzine AVA), 27-89 % (PA mit RIBI-Adjuvans), 45 % (Lebenssporen vom Stamm Sterne), 70 % (rekombinante *B. subtilis* Lebenssporen) oder 100 % (avirulente *B. anthracis*) erzielt worden. Dabei sind alle diese Werte aufgrund stark schwankender Versuchsbedingungen, insbesondere der Infektions-Dosis, nicht miteinander vergleichbar. Die bislang einzigen publizierten Infektions-Versuche mit Auszuchtmäusen und einem vollvirulenten Feldisolat von *B. anthracis* basierten auf der Immunisierung mit  $10^8$  attenuierten, rekombinanten (Pezard et al., 1995) oder Formalin-inaktivierten (Brossier et al., 2002) Sporen von *B. anthracis*. Es galt daher, ein eigenes geeignetes Auszucht-Mausmodell für präklinische Studien zu etablieren. Als ein generelles Problem der Versuche mit Auszuchtmäusen war die größere Schwankungsbreite der Immunreaktionen erwartet worden, weshalb zur statistischen Absicherung der Daten Versuchsgruppen mit 20 anstelle der sonst üblichen 10 Tieren eingeplant waren. Die Daten belegten jedoch, daß die Schwankungen innerhalb einer Gruppe von NMRI-Mäusen nicht größer als bei A/J-Mäusen waren und somit 10 Tiere pro Gruppe ausreichten.

Für die Arbeiten mit NMRI-Mäusen war zum einen die Bestimmung der  $LD_{50}$  für die subkutane Infektion mit Ames-Sporen und zum anderen die Etablierung eines Impfschemas, das als Positiv-Kontrolle dienen konnte, erforderlich. In fünf Versuchsgruppen wurde bei einer Abstufung der Infektionsdosis von  $3 \times 10^0$  bis  $6 \times 10^2$  Sporen die  $LD_{50}$  rechnerisch nach der Methode von Reed und Münch mit 38 Sporen bestimmt. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit von Ivins et al. (1990) für CBA/J-Mäuse publizierten Daten (35 Sporen).

Zur Etablierung der Positivkontrolle wurde ausgehend von eigenen Versuchsdaten ein bislang nicht publiziertes Schema verwendet. Vorversuche in A/J-Mäusen hatten nach 3facher Immunisierung mit nur 2,5 µg rPA + RIBI-Adjuvans und einer anschließenden Booster-Immunisierung mit  $6,4 \times 10^4$  Sporen vom Stamm STI, i. p., einen vollständigen Schutz gegen eine i. p. Infektion mit  $2,5 \times 10^5$  STI-Sporen bewirkt, einer Dosis, bei der die entsprechende Negativkontrolle nach 5 Tagen verstorben war. Dieses Immunisierungsschema wurde auf das Auszuchtmausmodell übertragen. NMRI-Mäuse erhielten 2 Grundimmunisierungen mit rPA und einem Adjuvans (RIBI-Trimix oder ein Lipopeptid) sowie einer Boosterimmunisierung mit einer avirulenten Sporen-Lebendvakzine (Stamm STI oder Sterne). In der Kombination rPA + RIBI-Adjuvans und  $9,6 \times 10^6$  Sporen vom Stamm STI überlebten 60 % die Belastungsinfektion mit 900 Sporen vom Stamm Ames, während in der Kombination rPA + Lipopeptid und  $1,6 \times 10^6$  Sporen vom Stamm Sterne 100 % der Tiere überlebten. Die Effektivität der Vakzinekandidaten wurde im folgenden an diesem Wert gemessen.

Immunologische Parameter, die sich zwischen diesen beiden Immunisierungsschemata unterschieden, waren insbesondere der höhere Anteil an PA spezifischen IgG2a-Ak in der mit RIBI immunisierten Gruppe und der deutlich höhere antiBclA-Titer in der mit Lebendsporen vom Stamm Sterne immunisierten Gruppe. Letzteres deutet darauf hin, daß die laboreigene Sporenpräparation für den Stamm Sterne einen höheren Anteil an dem Exosporium-Antigen BclA besitzt als die russische Vakzinepräparation.

In den beschriebenen Mausmodellen konnten alle orientierenden Fragestellungen zur Immunogenität von Vakzinekandidaten sinnvoll bearbeitet werden. Für die Beurteilung der Belastbarkeit der Immunantwort ist jedoch das Mausmodell aufgrund seiner genetischen Limitierungen nur sehr begrenzt geeignet. So ist z. B. eine Infektion im A/J-Mausmodell nur mit für den Menschen avirulenten Stämmen von *B. anthracis* möglich. Darüber hinaus reagieren bisher in Anthrax-Vakzinstudien eingesetzte Versuchsnager (Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Hamster) sehr unterschiedlich und in einer dem Menschen nicht vergleichbaren Weise sowohl auf die Infektion mit *B. anthracis* als auch auf am Menschen zugelassene Vakzinen. Letztere induzieren z. B. in der Maus und im syrischen Goldhamster keine (Fellows et al., 2002) und im Meerschweinchen nur begrenzte Schutzwirkung gegen eine Infektion. In publizierten Studien wurde jedoch gezeigt, daß eine dem Menschen vergleichbare Immunität im Kaninchen zu erzeugen ist. Neben Versuchen an nichthumanen Primaten steht daher als Alternative zu kleinen Nagern gegenwärtig das Kaninchen-Modell zur Verfügung (Fellows et al. 2001). Das beschriebene Versuchsprogramm enthielt daher eine Reihe orientierende Versuche zur Immunisierung von Kaninchen mit rPA und dem Lipopeptid-Adjuvans sowie mit optimierten Varianten der DNA-Vakzinekandidaten.

#### Immunantworten und Schutzraten im Maus- und Kaninchenmodell nach Immunisierung mit rekombinantem PA und verschiedenen Adjuvantien

Literaturdaten belegen die Protektivität einer mit rekombinantem PA parenteral induzierten Immunantwort im Meerschweinchen und in Mäusen (Übersicht bei Beyer, 2004). Die Immunogenität war dabei abhängig von den eingesetzten Adjuvantien (Ivins et al., 1990, 1992, 1995). Für das Kaninchen-Modell wurden erstmalig von Little et al. (2004) Daten zur Immunisierung mit rPA publiziert, während schon länger bekannt war, daß mit der azellulären Humanvakzine AVA ein voller Schutz zu erreichen ist. In eigenen Vorversuchen erwies sich die 3fache Immunisierung mit 2,5 µg rPA, das entspricht 1 Humandosis für AVA, gemischt mit RIBI-Adjuvans im A/J-Maus- und im Balb/c-Mausmodell als hoch immunogen. Das in

Tierversuchen sehr potente Adjuvans RIBI-Trimix ist jedoch für die Anwendung am Menschen nicht zugelassen und verursacht ähnliche Nebenwirkungen wie komplettes Freundsches Adjuvans.

Unter Anwendung des in der vorgelegten Arbeit etablierten Auszuchtmausmodells sowie in Kaninchen wurde daher ein von der Firma EMC Microcollections GmbH Tübingen zu beziehendes Lipopeptid-Adjuvans (LP), dessen Adjuvanswirkung bereits in anderem Zusammenhang belegt worden war (Bessler et al., 1997) im Vergleich mit Alhydrogel (Ah) bzw. der Humanvakzine (AVA) getestet. Das verwendete synthetische Lipopeptid basiert auf dem N-terminalen Anteil bakterieller Lipopeptide, enthält aber nur Palmitinsäure. Die Adjuvanswirkung dieser Moleküle wird zusätzlich verstärkt durch die Kopplung eines spezifischen T-Helferzellepitops. In den hier beschriebenen Versuchen wurde das mausspezifische Epitop (FISEAIIHVLHSRHPG) verwendet. Das Adjuvans wurde uns durch Herrn Prof. Bessler, Univ. Freiburg, zur Verfügung gestellt. Dieses Adjuvans verursachte keinerlei klinisch sichtbare Nebenwirkungen am Ort der Applikation und wurde offenbar sehr gut vertragen.

Im NMRI-Mausmodell wurde in 2 aufeinanderfolgenden Versuchen die Immunsierung mit rPA und LP zunächst gegenüber einer Immunisierung mit rPA und der Mischung aus LP und Ah und nachfolgend gegenüber einer Immunisierung mit rPA und Ah als Adjuvans getestet. Unterschiede in der Wirkung der beiden Adjuvantien ließen sich sowohl in den humoralen wie in den zellulären Immunantworten nachweisen. So induzierte LP signifikant höhere antiPA IgG2a-Titer und niedrigere IL-4 und IL-5 Werte. Im Belastungsversuch, bei dem die Tiere mit der 21fachen LD<sub>50</sub> Lebendsporen vom Stamm Ames, s. c., infiziert wurden, war die mit rPA und LP immunisierte Gruppe mit 80 % Überlebenden signifikant besser geschützt als die Negativkontrollen bzw. als die mit rPA und Ah behandelte Gruppe. Letztere war nicht signifikant besser geschützt als die Negativkontrollen. Für die Bewertung der immunologischen Daten war ihre Vorhersagekraft für den Ausgang der Infektionsversuche von Interesse. Weder die antiPA-ELISA Titer noch die Neutralisationstiter beider Adjuvansgruppen korrelierten jedoch mit den Schutzraten. Während in der mit rPA/LP-Adjuvans und Sterne-Lebendsporen immunisierten Positiv-Kontrollgruppe bei etwa gleich hohen antiPA gesamt Ig-Titern und eher geringeren Neutralisationstitern alle Tiere die Infektion überlebten, verstarben in den Versuchsgruppen nach Immunisierung mit rPA und LP oder Ah als Adjuvans Tiere mit hohen Ig-Titern und sowohl hohen als auch geringen Neutralisationstitern. Offenbar sind die gegen das PA gerichteten Antikörper zumindest im Mausmodell keine ausreichende Bedingung für das Überleben einer Infektion mit

vollvirulenten Sporen von *B. anthracis*. Im Unterschied zum Mausmodell ergaben die im weiteren durchgeführten Versuche zum Vergleich der beiden Adjuvantien im Kaninchenmodell, inklusive einer mit AVA behandelten Gruppe, keine Unterschiede in den humoralen Immunantworten oder in den Schutzraten nach 2facher Immunisierung und einer s. c. Belastungsinfektion mit  $2 \times 10^6$  Sporen vom Stamm Ames. In Übereinstimmung mit Literaturdaten überlebten alle Tiere der mit AVA immunisierten Gruppe die Infektion mit der 2000fachen LD<sub>50</sub> Lebendsporen, ebenso wie alle Tiere der mit rPA immunisierten Versuchsgruppen.

Überraschend waren in beiden Versuchsreihen jedoch die Ergebnisse der nur mit den Adjuvantien behandelten Kontrolltiere. Zunächst waren 3 Tiere einer nur mit LP behandelten Negativkontrollgruppe mit  $2 \times 10^5$  Sporen des Stammes Ames ( $100 \times \text{LD}_{50}$ ), s. c., infiziert worden. Diese Dosis für die subkutane Infektion war der Literatur entnommen (LD<sub>50</sub>:  $1,56 \times 10^3$  Sporen; LD<sub>99</sub>:  $2,83 \times 10^6$  Sporen; Zaucha et al., 1998), führte jedoch nur bei einem von drei Tieren zum Tod. Um den Einfluß einer möglichen unspezifischen Immunreaktion nach Adjuvansgabe in der Gruppe LP auszuschließen, wurde die Belastungsinfektion mit der gleichen Infektionsdosis mit einer Gruppe von 3 naiven Tieren wiederholt. Auch in diesem Fall verstarb nur 1 von 3 Tieren, sodaß die Dosis von  $100 \times \text{LD}_{50}$  des Stammes Ames für Kaninchen als nicht ausreichend zu bewerten war. Nach diesen Ergebnissen wurde die Infektionsdosis auf  $2 \times 10^6$  Sporen erhöht und erneut 3 naive und 3 mit LP vorbehandelte Kaninchen belastet. Während erstere Gruppe vollständig verstarb, überlebte aus der mit Adjuvans behandelten Gruppe wiederum 1 Tier. Auch in den Versuchen mit NMRI-Mäusen, die nur mit LP oder nur mit Ah behandelt worden waren, überlebten 30 % bzw. 40 % eine Infektion mit einer für die Negativgruppe tödlichen Dosis von 800 Sporen ( $21 \times \text{LD}_{50}$ ) des Ames-Stammes. In Übereinstimmung mit den publizierten Vakzinestudien war der Zeitpunkt der Infektion in allen hier relevanten Versuchen 4 Wochen nach der letzten Immunisierung gewählt worden. Dieser Zeitraum gilt allgemein als ausreichend, um den meßbaren Einfluß der unspezifischen Aktivierung des Immunsystems durch das Adjuvans auf den Ausgang einer Infektion vernachlässigbar klein zu halten. Zusammengenommen stützen diese Ergebnisse die These, daß auch noch nach einer Wartezeit von 4 Wochen nach der letzten Gabe von Adjuvans diese Tiere eine erhöhte allgemeine Reaktionslage des angeborenen Immunsystems aufweisen und damit weniger anfällig auf eine Infektion mit vollvirulenten Sporen reagieren. Gleichzeitig würde die Bestätigung dieser These wiederum die Bedeutung der Aktivierung angeborener zellvermittelter Immunmechanismen für die Abwehr einer Infektion mit *B. anthracis* unterstreichen.

Der Vergleich der immunologischen und Infektionsversuchsdaten aus den Mäuseversuchen lassen das verwendete Lipopeptid als Adjuvans dem in den herkömmlichen Humanvakzinen enthaltenen Aluminiumhydroxyd oder Alum als überlegen erscheinen. Die in den Versuchen mit Kaninchen analysierten Parameter sowie die bei allen Immunisierungen erzielten 100 % Schutzrate lassen dagegen keinen Unterschied zwischen beiden Adjuvantien erkennen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß unter anderen Bedingungen, z. B. einer suboptimalen Antigenkonzentrationen und/oder höheren Infektionsdosen, das Lipopeptid auch in diesem Tiermodell das effektivere Adjuvans darstellt.

#### Immunantworten und Schutzraten im Maus-, Kaninchen- und Schafmodell nach Immunisierung mit rekombinanten DNA-Vakzinekandidaten

Erste Versuche zur DNA Immunisierung von Mäusen gegen Milzbrand, von Gu et al. (1999) und Price et al. (2001), demonstrierten die Möglichkeit, zumindest einen partiellen Schutz mit einem PA63 exprimierenden eukaryontischen Plasmid gegen das Letaltoxin von *B. anthracis* zu induzieren. Mit stark verbesserten Expressionskassetten wurden diese Ergebnisse später auch im Kaninchenmodell bestätigt (Riemenschneider et al., 2003; Hermanson et al., 2004). In den hier vorgelegten Versuchen wurde die Immunogenität und Protektivität eigener eukaryontischer Expressionskassetten zunächst im Maus- und dann im Kaninchenmodell geprüft.

Die Versuche zur Immunisierung von Mäusen mit eukaryontischen Expressionskassetten in Form von gereinigter Plasmid-DNA wurden mit der in der Literatur beschriebenen Methodik für die intramuskuläre Injektion der DNA-Lösungen begonnen. Für spätere Versuche stand die Gen Gun (GG), ein Gerät zur intra- oder subkutanen Applikation von mit DNA beschichteten Goldpartikeln, mit Hilfe einer Helium-Druckpistole, zur Verfügung. Letztere Applikationsart ermöglicht eine weitaus effektivere Induktion von sowohl Th2 als auch Th1 basierten Immunantworten als bei der i. m. Injektion, bei gleichzeitig 250-500fach niedrigeren DNA-Dosen. So stieg in den Vorversuchen zur Immunisierung von Balb/c-Mäusen der gesamt Ig-Titer für die Immunisierung mit dem Plasmid pCMV/ER PA83 nach GG Applikation um ca. das 20fache und jener für die Immunisierung mit dem Plasmid pSecTag PA83 um das 3-4fache an. Verbunden damit war auch ein Anstieg in der Bildung von IL-4 und IL-5 nach Applikation dieser beiden Konstruktionen. Die in den Versuchen zur Immunisierung von Balb/c-Mäusen gemessenen ELISA-Titer der IgG-Subklassen in Verbindung mit den Werten für die Bildung von IL-4 und IL-5 demonstrieren eine Verschiebung der Immunantwort von einer Th1 basierenden nach i. m. Immunisierung hin zu

einer Th2 dominierten Antwort nach GG Immunisierung. Der auch dann vorhandene Th1-Anteil wird durch die anti-PA spezifischen IFN $\gamma$ -Werte belegt.

Die immunologischen Studien im Mausmodell dienten zum ersten dem Vergleich der Immunogenität und Protektivität des muren Antigen PA83 mit dem physiologisch aktiven Protein PA63. Ersteres induzierte dabei in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Flick-Smith et al. (2002) signifikant höhere Ak-Titer. Die Ursache für die unterschiedliche Immunogenität der beiden Proteine ist nicht bekannt. Zum zweiten sollte die Effektivität einer durch verschiedene Konstruktionen der Expressionskassetten bedingte unterschiedliche Präsentation des Antigen für die Erkennung durch immunkompetente Zellen getestet werden. Durch Nutzung unterschiedlicher Targeting-Signale auf den Expressionsplasmiden wird das Antigen entweder sekretiert oder im endoplasmatische Retikulum (ER) der exprimierenden Zellen verankert. Während das im ER verankerte Protein letztendlich als an MHC Klasse II gekoppeltes, zellständiges Antigen zur Erkennung durch T-Helferzellen dienen soll (Thalhamer et al., 2001), sollte das aus den Zellen exportierte Antigen, in Analogie zum unter natürlichen Bedingungen durch *B. anthracis* produzierten PA, als lösliches Antigen zur Stimulation von B-Zellen zur Verfügung stehen. Belege für die höhere Stimulation von B-Zellantworten durch sekretierte Proteine nach DNA-Vakzinierung enthalten die Arbeiten von Boyle et al. (1997), Bucht et al. (2001) und Scheiblhofer et al. (2001).

In den Versuchen zur Immunisierung von A/J-Mäusen mit der GG erzeugten die beiden getesteten Konstruktionen, pCMV/ER PA83 und pSecTag PA83, eine in den Gruppen homogene humorale Antwort mit hohen antiPA gesamt Ig-Antikörpertitern, die hauptsächlich zur IgG1-Subklasse gehörten. Die Unterschiede in den Titer-Mittelwerten der beiden Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Bei einer technisch bedingten minimalen Verdünnungsstufe von 1:50 waren jedoch nur in 2 von 13 (pSecTag PA83) bzw. 8 von 14 (pCMV/ER PA83) Tieren ein 50 %iger Neutralisationstiter (NT<sub>50</sub>) von 75 – 250 nachweisbar. Diese Titer lagen wesentlich niedriger als nach einer Immunisierung mit rPA und RIBI-Adjuvans (NT<sub>50</sub> von 9.530). Auch in der induzierten Protektivität im A/J-Mausmodell verhielten sich die beiden Plasmide nicht signifikant unterschiedlich. In den mit pSecTag PA83 immunisierten Gruppen überlebten abhängig von den Antigendosen 75-83 % der Tiere, in den mit pCMV/ER PA83 immunisierten Gruppen überlebten 57-100 %. Die Schutzraten beider Gruppen waren damit aber signifikant besser als jene der Negativkontrollen.

Im Vergleich von Balb/c- und A/J-Mäusen reagierten letztere mit 5fach und 10fach höheren Titern für gesamt Ig und IgG1 nach Immunisierung mit dem Plasmid pCMV/ER PA83 und mit 100fach höheren Titern für gesamt Ig und IgG1 nach Immunisierung mit dem Plasmid

pSecTag PA83. Die unterschiedliche Stärke der humoralen Immunantwort könnte auf dem unterschiedlichen immungenetischen Hintergrund der beiden Mauslinien beruhen. Allerdings wurden die DNA-Patronen für A/J-Mäuse auch mit einem erhöhten Heliumdruck verschossen, was zu einer veränderten Lokalisation der Goldpartikel und damit ihrer Verfügbarkeit für in der Haut vorhandene APC's geführt haben dürfte.

Wie bereits in den Versuchen mit rPA und Adjuvantien wurden auch hier die Daten der antiPA-ELISA Titer bzw. der Letaltoxineutralisationstiter auf eine Korrelation mit den Schutzraten geprüft. In der mit pSecTag PA83 immunisierten Gruppe starben 3 Tiere mit antiPA-Titern von 30.000 und 100.000. Zwei der Tiere hatten NT<sub>50</sub> von 35 und 400. Gleichzeitig überlebten jedoch 5 Tiere ohne meßbaren NT<sub>50</sub>. In der mit pCMV/ER PA83 immunisierten Gruppe starben 3 Tiere mit antiPA-Titern zwischen 6.000 und 80.000, die alle keinen meßbaren NT<sub>50</sub> hatten. Auch hier überlebten jedoch 4 Tiere ohne nachweisbaren NT<sub>50</sub>. Damit prognostizieren auch nach DNA-Immunsierung im Mausmodell die Daten zur humoralen Immunität nicht den Ausgang der Belastungsinfektion.

Die Ergebnisse aus vorangegangenen Versuchen zur Vakzinierung von A/J-Mäusen mit DNA-Vakzinekandidaten mittels Gen Gun ließen eine Weiterverfolgung dieser Applikation unter weiterer Optimierung der Expressionskassetten als sinnvoll erscheinen. Eine Verbesserung der humoralen Immunogenität des exprimierten PA sollte durch folgende Schritte erreicht werden: (1) durch das gezielte Einschleusen des Proteins in den MHC Klasse II-Präsentationsweg von APCs mit Hilfe des MHC Klasse II-Targetingsignals sowie der Ankersequenz der invarianten Kette der Maus (ivc), (2) durch Beschränkung des Antigens auf die physiologisch besonders bedeutsame Domäne 4 des PA (PAd4) und (3) durch die Verwendung eines chemisch synthetisierten Genfragments mit einer für die Maus optimierten Codon-Nutzung.

Zwei derartige Konstruktionen in verschiedenen Expressionsvektoren wurden im A/J-Modell miteinander verglichen. Die auf dem Vektor pVAX beruhende Expressionskassette pVAXivcPAd4 induzierte einheitlich bis zu 100fach höhere ELISA-Titer als die auf dem Vektor pCMV/myc/ER basierende Kassette pCMV/ERivcPAd4. Erstere wurde daher für Immunisierungs- und Infektionsversuche eingesetzt. Zusätzlich zu den Einzelkonstruktionen wurde dabei auch erstmalig eine Kombination aus dem für die PA-Sekretion kodierenden Plasmid pSecTagPA83 und dem pVAXivcPAd4 getestet. Dieser Kombination lag die Überlegung zugrunde, daß für die Aktivierung von sowohl B-Zellen als auch T-Helferzellen das Antigen in sowohl löslicher, extrazellulärer Form als auch in Verbindung mit MHC Klasse II auf APCs präsentiert werden sollte. Bei vergleichbar hohen Gesamt-Ig und IgG1-

Titern aller Versuchsgruppen waren jedoch keine NT<sub>50</sub>-Titer (< 50) für die mit dem Plasmid pVAXivcPAd4 geimpften Gruppen nachweisbar. In mehreren Versuchen zur Immunisierung mit dieser Kassette, in denen zunächst A/J-Mäuse mit ca. 1 x 10<sup>6</sup> Sporen vom Stamm STI und im weiteren NMRI-Mäuse mit 900 Sporen vom Stamm Ames belastet wurden, schwankten die Überlebensraten zwischen 83 % und 10 % im A/J-Mausversuch und 30 % im NMRI-Mausversuch. Aufgrund dieser unbefriedigenden Ergebnisse wurde in den Folgeversuchen mit NMRI-Auszuchtmäusen dieser Ansatz nicht weiter verwendet.

Eine weitere Möglichkeit der Verbesserung der Protektivität von auf PA basierenden Vakzinekandidaten stellt deren Kombination mit zusätzlichen, z. B. sporenssoziierten Antigenen dar. Das Ziel einer solchen Kombination ist die Ergänzung der ausschließlich gegen das Toxin gerichteten Immunität durch eine zusätzliche anti-bakterielle Komponente.

Mit dem *Bacillus collagen-like protein of anthracis* (BclA), einem Immunogen aus dem Exosporium von Bazillen (Sylvestre et al., 2002; Steichen et al., 2003), sollte im weiteren geprüft werden, ob die durch rPA induzierte Protektivität gegenüber einer Infektion mit vollvirulentem *B. anthracis* gesteigert werden kann. Da die internen collagen-like repeat Sequenzen in den bclA-Allelen von verschiedenen Stämmen eine hohe Variabilität besitzen, wurden die Gene für zwei in diesem Locus sehr unterschiedliche Stämme, A1 und A49, aus der Stammsammlung des Instituts ausgewählt. Der Stamm A1, der als „Sterne“ in der Sammlung geführt wird, enthält ein bclA-Gen von ca. 1250 bp. Der Stamm A49 ist ein aus einem Rind isolierter Wildtyp mit einer bclA-Sequenz von ca. 800 bp. Beide Gene wurden in pro- und eucaryontische Expressionsvektoren kloniert, die dann für die Herstellung größerer Mengen des rekombinanten Proteins zur Verfügung standen.

Nach der erfolgreichen Etablierung des Auszucht-Mausmodells konnte die neue, für das Sporenantigen kodierende Expressionskassette im Vergleich mit bisherigen Konstruktionen erstmalig in diesem Modell getestet werden. Diese Testreihe stellt den nach unserer Kenntnis weltweit ersten Versuch dar, Auszuchtmäuse durch eine DNA-Vakzinierung gegen eine Infektion mit vollvirulentem *B. anthracis* zu schützen. Im ersten Schritt wurde geprüft, ob die im A/J-Modell erfolgreich getesteten Plasmidkonstruktionen pSecTagPA83 und pCMV/ERPA83 in Kombination auch im Auszuchtmausmodell eine protektive Wirkung haben und danach, ob die durch eine PA-Immunisierung induzierte Protektivität durch eine gleichzeitige anti-Sporen Immunisierung verstärkt werden kann.

Die immunologischen Daten von NMRI-Mäusen zeigten sowohl eine gute Immunogenität des in der eukaryontischen Sekretionskassette (pSecTagbclA1) kodierten Sporenantigens als auch eine den jeweils einzelnen Plasmiden im A/J-Modell vergleichbare Immunogenität der

Kombination aus pSecTagPA83 und pCMV/ERPA83. Letztere führte wie bei A/J-Mäusen auch im NMRI-Mausmodell zu keinen meßbaren Neutralisationstitem, was den Vorhersagewert dieses Parameters für die Schutzwirkung nach DNA-Immunisierung im Mausmodell insgesamt in Frage stellt. Die Kombination aus allen 3 Vektoren führte zu ELISA-Titern für beide Antigene, die zu den Titern aus den Versuchen mit den jeweiligen Einzelplasmiden vergleichbar hoch waren.

Nach der Belastungsinfektion mit  $9.34 \times 10^2$  Sporen Ames, s. c. (ca.  $25 \times LD_{50}$ ), 28 Tage nach der letzten Immunisierung, wurden die Überlebensraten der Gruppen mit dem log-rank-Test auf Signifikanz überprüft. Dabei war nur die 50 %ige Schutzrate der Gruppe, die alle 3 Vektoren und damit die Kombination aus antiPA- und anti-BclA Immunisierung erhalten hatte sowie das Überleben der Positivkontrollgruppe (100 %) signifikant besser als das der Negativkontrolle (0 %).

Das Ergebnis zeigt erstmalig die Möglichkeit, eine Auszucht-Mauslinie mittels DNA-Immunisierung zumindest partiell gegen eine Infektion mit vollvirulentem *B. anthracis* zu schützen.

Nachdem die orientierenden Fragestellungen zur Immunogenität und Protektivität der DNA-Vakzinekandidaten im Mausmodell bearbeitet worden waren, sollte im weiteren die Belastbarkeit der Immunantwort im Kaninchenmodell geprüft werden. Wie in publizierten Studien bereits gezeigt worden war, ist eine dem Menschen vergleichbare Immunität eher im Kaninchen zu erzeugen als in kleinen Nagern wie Maus, Ratte oder Meerschweinchen. Im nächsten Schritt wurde daher ein orientierender Versuch zur Immunisierung von Kaninchen mit der optimierten Kombination der DNA-Vakzinekandidaten durchgeführt. Für die Versuche stand ein nichtkommerzielles Versuchsadjuvans (Vaxfectin) der Firma Vical (San Diego, Kalifornien) zur DNA-Immunisierung, auf der Basis einer schriftlichen Vereinbarung, zur Verfügung. Die Tiere wurden 32 Tage nach der letzten Immunisierung mit  $2 \times 10^6$  Ames Sporen ( $2000 \times LD_{50}$ ), s. c., zwischen den Schulterblättern infiziert. Die Dreifachimmunisierung mit den antigenkodierenden Plasmiden führte zu einem signifikanten Anstieg der antiPA- und der antiBclA-IgG Titer im Vergleich zur Negativkontrolle. Aufgrund der Nichtverfügbarkeit von entsprechenden Antikörperpräparationen konnten die IgG-Subklassenantwort nicht weiter differenziert werden. Die Infektion mit  $2 \times 10^6$  Sporen vom Stamm Ames überlebten 2 der 3 Tiere über 14 Tage Beobachtungszeit. Ein Kaninchen verstarb nach 4 Tagen. Die Schutzrate ist somit gegenüber einer Negativkontrolle nicht signifikant. Für eine statistische Absicherung der Ergebnisse wäre die Erweiterung der

Tierzahlen notwendig gewesen, wofür jedoch keine weiteren Projektmittel mehr zur Verfügung standen.

Parallel zu den Untersuchungen in Kaninchen wurden zwei Plasmid-Kombinationen auf Immunogenität in Schafen getestet. Über einen Zeitraum von bis zu 1 Monat nach der 3. Immunisierung stiegen die antiPA-Titer der DNA vakzinieren Tiere kontinuierlich an, wobei ab der 2. Immunisierung höhere Titer in den Gruppen mit als in denen ohne Adjuvansgabe gemessen wurden (Aichler, 2004).

Überraschend war, daß bei der Titerbestimmung ca. 1 Jahr nach Immunisierungsbeginn (11 Monate nach der 3. Immunisierung) der IgG-Titer der mit rPA + Aluminiumhydroxyd immunisierten Positivkontrollgruppe signifikant abgesunken war, während sich der Titer in zumindest einer der DNA-Vakzinegruppen nur unwesentlich verändert hatte (Hahn et al., 2004, 2005b). Im Vergleich der zwei eingesetzten Plasmidkombinationen, sekretiertes Protein + ER-retentiertes Protein und sekretiertes Protein + Fusionsprotein aus Domäne 4 des PA und der invarianten Kette der Maus (ivc), erzielte nur die letztere signifikant positive Ergebnisse sowohl im Ak-Titer, als auch im Lymphozytenproliferationstest. Über die Protektivität dieser Immunantworten können keine Aussagen gemacht werden, da es im Gegensatz zum Kaninchenmodell (positive Korrelation), dem Maus- und dem Meerschweinchenmodell (beide keine Korrelation) keine publizierten Daten über die Korrelation von antiPA ELISA-Titern und Protektivität in Schafen gibt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß mit der zuletzt getesteten Kombination aus PA83 exprimierenden Kassetten, die das Antigen sowohl in sekretierter als auch in ER-gebundener Form bereitstellen, und BclA exprimierenden Kassetten protektive Immunantworten induziert werden konnten. Der Versuch in Schafen zeigte zudem die immunogenitätssteigernde Wirkung eines entsprechenden Adjuvans. Um in weiterführenden Versuchen eine neue Qualität zu erreichen, wäre es vor allem notwendig, ein komplettes PA-Gen mit einer säugetierspezifischen Codon-Nutzung zur Verfügung zu stellen. Darüber hinaus würde die Überführung der Vakzinekandidaten aus den präklinischen in klinische Versuche, aber wohl auch ihre Verwendung für veterinärmedizinische Zwecke, eine Minimierung der plasmidspezifischen Sequenzen, insbesondere der Resistenzkassetten auf den Vektorplasmiden, erforderlich machen.

### Immunantworten und Schutzraten in verschiedenen Mausmodellen nach Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen

Die Möglichkeit der effektiven Präsentation von Protein-Antigenen durch Verwendung lebender, attenuierter Salmonellen wurde vielfach beschrieben (Curtiss et al., 1988, 1989, 1990, 1994; Cardenas und Clements, 1993; Hormaeche und Khan, 1996). Ihre besondere Eignung zur Verwendung als Vektoren zur Präsentation von Fremdanitgenen und damit für die Entwicklung rekombinanter Vakzinen ist durch den Pathogenese-Mechanismus und verbunden damit durch die Art und Weise der Kontaktaufnahme zwischen Bakterien und immunkompetenten Zellen begründet.

Coulson et al. (1994) publizierten erstmalig Impfversuche mit einem rPA-exprimierenden *S. enterica* Serovar Typhimurium, Stamm SL3261. Aufgrund einer eher ungeeigneten Expressionskassette induzierte dieser Vektor selbst nach i. v. Applikation keine meßbaren Antikörper. Dennoch war ein Teil der Tiere vor einer Belastungsinfektion geschützt.

Forschungsarbeiten, die die Verbesserung der Expression von Fremdanitgenen in Salmonellen als Lebendvakzine zum Ziel hatten, haben kürzlich zur Entwicklung des Hämolyisin-Export-Expressionssystems für rekombinante Salmonellen geführt (Gentshev et al., 1996; Hahn et al., 1998; Hess und Kauffmann, 1999; Hess et al., 2000a; Hess et al., 2000b). Dieses System erlaubt die erhöhte Expression von Fremdproteinen in Salmonellen bei gleichzeitigem Export des Proteins in den das Bakterium umgebenden Raum. Da Salmonellen intrazellulär im Endosom verbleiben, sollte es dort bei konstanter Expression des Antigens zu dessen Anreicherung und Einschleusung in den MHC II vermittelten Antigenpräsentationsweg und damit zur Stimulation von spezifischen T-Helferzellen kommen.

Nach der originären Klonierung des PA83ec-Gens aus dem Plasmid p19PA (übernommen von R. Titball, DSTL, Porton Down, UK) mit den Regulationssignalen im Plasmid pQE30, wurden die zur Immunisierung von Mäusen verwendeten pro- und eukaryontischen Expressionskassetten für die Proteine PA83ec und PA63ec im Impfstamm Zoosaloral H kloniert. Die Konstruktionen mit dem prokaryontischen Plasmidvektor pVDL9.3 ermöglichen durch Fusion des Antigens mit der Signalsequenz aus dem hlyA-Gen des Hämolyisins von *E. coli* sowie der Kombination mit den Genen B und D dieses Sekretionssystems den Export des rekombinanten Proteins in den periplasmatischen bzw. den extrazellulären Raum. Nach Überführung der vollständigen Exportkassette aus dem Plasmidvektor pVDL9.3 auf das Minitransposon miniTn5pUTKm und konjugativem Transfer dieses Vektors aus *E. coli* in Zoosaloral H wurden Exkonjuganten mit stabil in das Chromosom integrierten Exportkassetten für PA83ec isoliert. Durch Southern-Blotting der genomischen DNA und

Hybridisierung mit markierten PA-DNA Fragmenten wurde die Integration von jeweils nur einer Kopie der Kasette in unterschiedliche, nicht näher bestimmte Positionen auf dem Chromosom bestätigt.

Zusätzlich wurde im Vektorplasmid pVDL9.3 eine N-terminale translationale Fusion des PA63ec mit einem immunogenen Peptid aus dem Interleukin-1 $\beta$  (IL-1) Gen der Maus erstellt. Dieses Peptid besitzt immunostimulatorische Eigenschaften, ohne jedoch die für IL-1 $\beta$  bekannten inflammatorischen, vasoaktiven und andere systemtoxische Eigenschaften zu haben (Boraschi und Tagliabue, 1999, Chen et al., 1998).

Zu Beginn der Experimente war darüber zu entscheiden, ob die Belastungsinfektion mit Lebendsporen von *B. anthracis* oder dem Letaltoxigen erfolgen soll. Neuere Literaturdaten präferieren für die Testung von Vakzinekandidaten in der Maus ein Modell, bei dem der Mausstamm A/J mit definierten Sporenmengen eines für den Menschen avirulenten Vakzinestammes von *B. anthracis* (STI), i. p., belastet wird. Ein Problem des beschriebenen Modells für Immunisierungsversuche mit rekombinanten Salmonellen liegt in der relativen Unempfindlichkeit der A/J-Inzuchtlinie gegenüber *S. enterica*, Serotyp Typhimurium. Während A/J-Mäuse aufgrund eines Defekts in der Produktion von C5 (Komplement-Kaskade) eine hohe Empfindlichkeit gegenüber einer Belastung mit vermehrungsfähigem *B. anthracis* aufweisen, sind sie Träger des Ity<sup>r</sup>-Allels im Nramp-Locus und damit relativ resistent gegenüber einer Belastung mit intrazellulären Erregern. Demgegenüber tragen Balb/c-Mäuse das Ity<sup>s</sup>-Allel, was diese Linie zum bevorzugten Modell für alle Versuche zur Immunisierung mit Salmonellen vom Serotyp Typhimurium macht. Gleichzeitig sind Balb/c-Mäuse jedoch hoch resistent gegenüber einer Infektion mit toxigenen, nicht kapselbildenden *B. anthracis* und daher als Modell für eine Belastungsinfektion mit nicht toxinbildenden Sporen ungeeignet. Es wurde daher entschieden, beide Mausmodelle einzusetzen, wobei A/J-Mäuse mit STI-Sporen belastet wurden, Balb/c-Mäuse jedoch mit einem rekombinanten Letaltoxigen. Letzteres Challenge-Modell war von Price et al. (2001) zur Demonstration einer protektiven Immunität nach DNA-Immunisierung verwendet worden. Wie die Ergebnisse jedoch zeigten, ist das Toxin-Belastungsmodell mit einer Reihe von Problemen behaftet, die es für weitere Versuche als ungeeignet erscheinen ließen. So zeigten die als LD<sub>50</sub> für Balb/c-Mäuse publizierten Werte (Price et al., 2001) nicht die erwartete Letalitätsrate in den eigenen Versuchen. Sie wichen auch erheblich von den am USAMRIID verwendeten Dosen ab (Leppla, pers. Mittlg.). Die letztendlich erforderlichen höheren Dosen hätten die Versuchskosten erheblich gesteigert (ca. 1200 Euro für 10 Versuchsdosen).

Aufgrund der bereits beschriebenen Nachteile des A/J-Mausmodells in Bezug auf die nur mit avirulenten Sporen durchführbare Belastungsinfektion und damit für die Beurteilung der Protektivität von Immunantworten, wurde in späteren Versuchen das neu etablierte Auszuchtmausmodell verwendet.

Die orale Immunisierung der beiden Mäuse-Inzuchtlinien führte zu sehr heterogenen Ak-Anworten gegen PA, die vor allem durch die Dominanz von Ak der Subklasse IgG2a und PA-spezifischen IFN $\gamma$ -Antworten geprägt waren (Beyer et al., 2001; Beyer et al., 2003). Diese für eine durch Th1 dominierte Immunantwort typischen Parameter entsprechen den Erwartungen bei einer oralen Verabreichung von lebenden Salmonellen. Sowohl plasmidal wie chromosomal integrierte prokaryontische Expressionskassetten, die für das Fusionsprotein PA63ec-'HlyA bzw. die Fusion aus PA63ec-'HlyA und dem IL-1-Peptid kodierten, induzierten keine bzw. nur in wenigen Einzeltieren eine antiPA spezifische Antikörperantwort. Nach Integration des IL-1 Peptids war eine leichte immunogenitätssteigernde Wirkung in den IFN- $\gamma$  Werten ablesbar. Im Vergleich zu anderen PA63ec kodierenden Konstruktionen hatte nur dieses Fusionsprotein einen signifikant höheren IFN- $\gamma$  Wert als die Negativkontrollen. Insgesamt sprachen die Ergebnisse jedoch nicht für eine Weiterführung der auf dem PA63ec-Genfragment beruhenden Kandidaten.

Gleiches galt auch für alle getesteten Konstruktionen mit eukaryontischen Expressionskassetten.

Die stärksten Immunreaktionen in Bezug auf antiPA spezifische Antikörper und IFN $\gamma$ -Bildung wurden nach Immunisierung mit prokaryontischen Expressionskassetten durch das plasmidal oder chromosomal integrierte Fusionsprotein PA83ec-'HlyA erzeugt. Im Belastungsversuch mit ca.  $1,5 \times 10^6$  Sporen ( $100 \times LD_{50}$ ) vom Stamm STI überlebten die mit diesen beiden Vektoren immunisierten Gruppen signifikant besser als die Negativkontrollgruppe. Damit bestätigten sich in den Versuchen mit Salmonellen die aus den DNA-Vakzineversuchen belegte stärkere Immunogenität des maturen Proteins PA83 gegenüber seiner physiologisch aktiven Form PA63.

Keines der gestorbenen und überraschenderweise auch keines der überlebenden Tiere hatte nach Abschluß der Immunisierungen einen meßbaren Letaltoxineutralisationstiter. Auch nach der Infektion schwankte dieser Wert über 2 log<sub>10</sub>-Stufen.

Damit bestätigte sich auch in den Versuchen mit Salmonellen die Beobachtung aus den Versuchen mit rPA und verschiedenen Adjuvantien, nämlich daß im Mausmodell (1) weder die antiPA-ELISA Titer noch die Neutralisationstiter den Ausgang der Infektion prognostizieren lassen und (2) die humorale Immunität gegen das Letaltoxin für das

Überstehen der Infektion nicht von ausschlaggebender Bedeutung ist. Gleichzeitig wird mit dieser Schlußfolgerung die Bedeutung unterstrichen, die eine gegen die Vermehrung des Erregers gerichtete Immunität und damit die Integration eines bakteriellen Antigens bei der Entwicklung künftiger Vakzinen haben sollte.

Studien mit auf verschiedene Art und Weise attenuierten Salmonella-Stämmen belegen einen Einfluß der Attenuierungsmarker auf die Immunogenität des Wirtsstammes sowie darin exprimierter Fremdantigene (Dunstan et al., 1998). So kommt der Verweildauer von Mutanten im lymphoretikulären Gewebe der Peyerschen Platten eine besondere Bedeutung zu. Diese Verweildauer ist für verschieden attenuierte Mutanten von Salmonellen des Serotyps Typhimurium unterschiedlich, ebenso wie die Fähigkeit, in innere Organe vorzudringen und sich dort zu replizieren. Demnach sollte der genetische Hintergrund der verwendeten Salmonellen auf die Immunogenität des exprimierten PA einen Einfluß haben. Der hier verwendete Impfstamm Zoosaloral H ist in Bezug auf seine Verweildauer in der Leber und Milz, nicht aber in den PP von Mäusen charakterisiert. Daten für Balb/c-Mäuse liegen jedoch für den Typhimurium – Impfstamm SL3264 aroA (Hoiseh und Stocker, 1981) vor. Daher wurde bei einem Versuch die plasmidkodierte Expressionskassette pVDL9.3PA83ec in den Stamm SL3264 kloniert und damit immunisierte A/J-Mäuse in einer Belastungsinfektion getestet. Tatsächlich waren die Daten mit dieser Konstruktion jedoch eher schlechter als die mit dem vergleichbaren Vakzinestamm Zoosaloral H erreichten Ergebnisse.

In einem weiteren Versuch zur Optimierung der Antigenexpression in Salmonellen (Daten nicht gezeigt) sollten neue Erkenntnisse einer Arbeitsgruppe am Max v. Pettenkofer Institut über die Möglichkeit der Expression von Fremdantigenen als Fusionsprotein mit einem Effektorprotein (YopE) aus dem TypIII-Exportsystem von Yersinien auf ihre Anwendbarkeit für die Entwicklung einer oralen Immunisierung mit Salmonellen geprüft werden. Durch die Fusion von PA an YopE und dessen Export durch das bei Salmonellen auf der Pathogenitätsinsel 1 (SPI-1) kodierte TypIII-Sekretionssystem sollte eine bis zu 10fach gesteigerte Expression von PA möglich sein (H. Rüssmann, pers. Mittlg.). Die veränderte Lokalisation des Proteins sowie die Erhöhung der Expressions-Dosis ließen eine Steigerung der Effektivität dieser Rekombinante als orale Vakzine erwarten. In Zusammenarbeit mit V. Rüssmann wurden 2 Plasmid-Konstruktionen in Salmonellen erstellt, die zum einen eine Fusion aus dem YopE (AS 1-18) und PA83 (pHR482) oder eine Fusion aus dem YopE (AS 1-138) und dem PA83 (pHR483) enthielten. Die erste Variante kodiert für das Signal zur

Sekretion des Fusionsproteins aus dem Bakterium, die zweite Variante für die Sekretion und Translokation des Fusionsproteins in Darmepithelien.

Beide Varianten wurden als rekombinante Salmonellen, ZpHR482 und ZpHR483, für Versuche zur oralen Immunisierung von NMRI-Mäusen eingesetzt. Nur 5 von 20 Tieren der Gruppe ZpHR483 entwickelten daraufhin PA-spezifische Antikörper und die Überlebensrate der mit ZpHR482 oder ZpHR483 immunisierten Versuchsgruppen war nicht signifikant besser als jene der Negativkontrollen. Obwohl dies der erste Versuch einer oralen Immunisierung von NMRI-Auszuchtmäusen mit einer rekombinanten Salmonellen-Vakzine war, deutet der Vergleich mit aus früheren Versuchen im A/J-Modell und im Balb/c-Modell gewonnenen Daten auf eine eher schlechtere orale Immunogenität der neuen Konstruktionen hin.

Mit Immunisierungsraten von < 40 % und Schutzraten von 27,5 % für alle Versuchstiere bzw. 44 % für serokonvertierte Tiere liegen die insgesamt nach oraler Immunisierung von A/J-Mäusen erzielten Ergebnisse weit unter denen, die nach einer i. v. Applikation der chromosomal integrierten Expressionskassette im Zoosaloral H (ZpUTKm PA83ec) erzielt worden waren (Garmory et al., 2003). Sie erreichen auch nicht die bereits mit DNA-Vakzinekandidaten bzw. mit rekombinanten Proteinvakzinen erzielten Ergebnisse. Andererseits belegen die Ergebnisse zum 100 %igen Schutz gegen eine Infektion mit  $1 \times 10^6$  Sporen vom Stamm STI, nach i. v. Applikation, die prinzipielle Möglichkeit, Tiere mit einem durch Salmonellen exprimierten PA83 erfolgreich zu immunisieren (Garmory et al., 2003).

Anknüpfend an diese Daten wäre in Folgeversuchen zu prüfen, wie die bisher unzureichende Immunogenität nach oraler Applikation verbessert werden kann. Ein möglicher Ansatz dafür ist der Austausch des die Expression von rPA in den beschriebenen Konstruktionen steuernden konstitutiven Promotors durch einen intrazellulär induzierbaren Promotor. Erste Versuche mit dem pagC-Promotor im Rahmen einer in der Arbeitsgruppe angefertigten Diplomarbeit (Konradt, 2005) zeigten noch keine Verbesserung der Immunogenität des Antigens nach oraler Applikation an NMRI-Mäuse (Daten nicht gezeigt).

## 6. Ausblick

Der Milzbrand ist eine der ersten Krankheiten, deren Ätiologie aufgeklärt und für die eine gezielte Immunprophylaxe eingeführt wurde. In der Aufklärung der Wirkungen der Toxinkomponenten und ihrer Regulation wurden in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt (Koehler, 2002). Dennoch sind wir derzeit nicht in der Lage, die Pathogenese und dabei auch die Letalität der Krankheit auf zellulärer Ebene schlüssig zu erklären (Moayeri et al., 2003). Ebenso muß die Natur der Infektionsimmunität nach überstandener Krankheit noch als unverstanden gelten. Nach der Entdeckung des Protektiven Antigens als wesentliche Komponente der humoralen, erworbenen Immunität konzentrierte sich die Forschung jahrzehntelang nur auf die Wirkung von Toxoid-Vakzinen. So werden auch die derzeit in den USA und in England für die Neuzulassung in Vorbereitung befindlichen Vakzinen nur aus dem rekombinanten PA und dem klassischen Adjuvans Alum bestehen. Auf Grund der Erfahrungen mit diesem Vakzinotyp, insbesondere im Meerschweinchenmodell und in immunsupprimierten Maus-Inzuchtlinien, sind jedoch Zweifel angebracht, ob damit tatsächlich eine wirksame, lang anhaltende und in einer großen menschlichen Population ausreichend effektive Immunprophylaxe zu erreichen ist. Die Weiterführung der laufenden Arbeiten zur Erweiterung der Antigenität der Vakzine durch Antigene der Spore oder/und der vegetativen Zelle sowie zur Verbesserung der Adjuvantien erscheint insbesondere im Hinblick auf einen erweiterten Einsatz dieser Vakzinen, zum Beispiel bei Armeeangehörigen oder Risikopersonal in Laboratorien und Kliniken, dringend geboten. Ebenso notwendig wäre die bislang vernachlässigte Erforschung der Rolle der angeborenen Immunmechanismen bei der Eliminierung der Erreger. DNA-Vakzinen könnten in der Zukunft auf Grund der relativ einfachen Möglichkeiten zur gezielten Steuerung der Immunantwort eine neue Vakzine-Generation darstellen. Am wenigsten entwickelt zeigen sich derzeit die Möglichkeiten der mukosalen, vor allem der oralen oder nasalen Vakzinierung mit Lebendvektoren gegen Anthrax, obwohl gerade diese Applikationsformen gegenüber der Nadelinjektion viele Vorteile haben (Übersichtsartikel von: Mollenkopf et al., 2001; Weiss und Krusch, 2001; Mielcarek et al., 2001). Für beide Vakzineformen wäre es notwendig zu zeigen, daß die in Labortieren bereits erzielten Erfolge auch im Menschen reproduziert werden können und die Risiken nicht größer sind, als durch den Einsatz der klassischen Protein-Vakzinen.

Für alle zukünftigen Vakzinen gilt, daß es gelingen muß, die jeder Anstrengung zur Entwicklung einer Vakzine gegen eine Letalinfection des Menschen immanente Schwierigkeit der Effektivitätsprüfung am Zielorganismus dadurch zu überwinden, daß verlässliche immunologische Korrelate für die Protektivität definiert werden. Sie werden in

Zukunft die Grundlage für die Zulassung dieser Vakzinen bilden müssen. Für die gegenwärtig in der Anwendung befindlichen Vakzinen AVA und UK-AV wie auch für die künftigen, ausschließlich auf dem Toxinbestandteil Protektives Antigen beruhenden rekombinanten Vakzinen wurden von einigen Autoren die Toxin-Neutralisationstiter (NT), gemessen im Makrophagen-Zellkultursystem, und die Menge an antiPA-IgG als immunologisches Korrelat für einen bestehenden Schutz vorgeschlagen. Die Begründung, diese Parameter für künftige rPA-basierende Vakzinen für den Menschen als Korrelate für Immunität zu benutzen, beruht auf Daten aus Versuchen mit Meerschweinchen (Reuveny et al., 2001) und Kaninchen (Pitt et al., 2001; Little et al., 2004), in denen eine Korrelation zwischen Überlebensraten einerseits und Neutralisationstitern bzw. der Konzentration von antiPA-IgG zu definierten Zeiten vor der Belastungsinfektion andererseits gefunden worden waren. In eigenen Versuchen mit Mäusen und Kaninchen nach DNA-Vakzinierung hatte dieser Parameter jedoch keinerlei Voraussagewert für die Überlebenschancen des einzelnen Tieres, was auf mögliche grundsätzliche Unterschiede der Immunantworten nach Protein- und DNA-Vakzinierung zurückgeführt werden könnte. Darüber hinaus gibt die Unabhängigkeit der Überlebensraten von den NT Werten in letzteren Versuchen aber auch einen Hinweis auf die Bedeutung der zellvermittelten und insbesondere der angeborenen Immunmechanismen bei der Eliminierung des Erregers. Die Aussagekraft der Parameter NT und antiPA-IgG für eine Immunität des Menschen gegen die Infektion mit *B. anthracis* ließe sich zweifelsfrei nur durch ethisch nicht vertretbare Infektionsversuche klären oder mit Hilfe epidemiologischer Daten bezüglich der Korrelation von immunologischen Parametern und dem Überstehen der Infektion, wie sie eventuell aus Endemiegebieten gewonnen werden könnten. Solche Daten liegen derzeit jedoch nicht vor. Auf umfangreiche Studien an Rhesus-Affen zur Gewinnung statistisch signifikanter Korrelationswerte wurde bislang auf Grund der mit diesem Modell verknüpften finanziellen, organisatorischen und wohl auch ethischen Probleme verzichtet. Unabhängig vom eingesetzten Tiermodell wird immer ein Rest an Zweifeln darüber bestehen bleiben, wie verlässlich die an einer kleinen Population von speziell gezüchteten Labortieren gewonnenen Daten auf den Menschen übertragen werden können. Damit bleibt wohl auch für künftig einzusetzende Vakzinen ein Restrisiko bestehen, das in der Abwägung kleiner ausfallen muß als jenes, der Infektion zu erliegen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abrami, L., S. Liu, P. Cosson, S.H. Leppla, F.G. van der Goot (2003): Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J. Cell. Biol.* **3**, 321-328.
2. Abramova, F.A., L.M. Grinberg, O.V. Yampolskaya, D.H. Walker (1993): Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2291-2294.
3. Aggarwal, A., S. Kumar, R. Jaffe, D. Hone, M. Gross und I. Sadoff (1990): Oral *Salmonella*: Malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8+ cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.* **172**, 1083-1090.
4. Ahuja, N., P. Kumar, R. Bhatnagar (2001): Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon*. **39**:1747-1755.
5. Aichler (2004): DNA-Vakzinierung von Schafen gegen *Bacillus anthracis*. Diplomarbeit im Studiengang Agrarbiologie. Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim.
6. Alarcon, J.B., G.W. Waine, D.P. McManus (1999): DNA Vaccines: technology and application as antiparasite and anti-microbial agents. *Adv. Parasitol.* **42**: 344-390.
7. Ariel, N., A. Zvi, H. Grosfeld, O. Gat, Y. Inbar, B. Velan, S. Cohen, A. Shafferman (2002): Search for potential vaccine candidate open reading frames in the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO1: In silico and in vitro screening. *Infect. Immun.* **70**, 6817-6827.
8. Auerbach, S., G.G. Wright (1955): Studies on immunity in anthrax. VI. Immunizing activity of protective antigen against various strains of *Bacillus anthracis*. *J. Immunol.* **75**, 129-133.
9. Bail, O. (1904): Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität. *Zbl. Bakt.* **37**, 270-280.
10. Baillie, L., R. Hebdon, H. Flick-Smith, D. Williamson (2003): Characterisation of the immune response to the UK human anthrax vaccine. *FEMS* **36**, 83-86.
11. Baillie, L., A. Moir, and R. Manchee (1998): The expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* in *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 741-6.
12. Barnard, J.P., A.M. Friedlander (1999): Vaccination against anthrax with attenuated recombinant strains of *Bacillus anthracis* that produce protective antigen. *Infect. Immun.* **67**, 562-567.
13. Beauregard, K.E., R.J. Collier, J.A. Swanson (2000): Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalization. *Cell. Microbiol.* **2**, 251-258.
14. Beedham, R.J., P.C. Turnbull, E.D. Williamson (2001): Passive transfer of protection against *Bacillus anthracis* infection in a murine model. *Vaccine* **19**, 4409-4416.
15. Belton F.C., R.E. Strange (1954): Studies on a protective antigen produced in vitro from *Bacillus anthracis*: medium and methods of production. *Br. J. Expt. Pathol.* **35**, 144-152.
16. Benson, E.L., P.D. Huynh, A. Finkelstein, R.J. Collier (1998): Identification of residues lining the Anthrax protective antigen channel. *Biochemistry* **37**, 3941-3948.
17. Beyer W. (2004): Strategies of vaccination against anthrax. *Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. (BMTW)*, in German, **117**, 508-524.
18. Beyer, W., K.E. Griffin, H.S. Garmory, R.W. Titball (2001): Improvements in the development of live *Salmonella* vectors for the delivery of vaccine candidates against *B. anthracis*. Abstract book, 4<sup>th</sup> Int. Confer. Anthrax, Juni 10.-13., Annapolis, USA, p. 47.
19. Beyer, W., U. Hahn, K.E. Griffin, H.S. Garmory, R.W. Titball, R. Böhm (2003): Development of live recombinant *Salmonella* vectors as vaccine candidates against *B.*

- anthracis*. Abstract book, 5<sup>th</sup> Int. Confer. Anthrax, 30. März - 3. April, Nizza, Frankreich, S. 81.
20. Black, R.E., M.M. Levine, M.L. Clements, G. Losonsky, D. Herrington, S. Berman, S.B. Formal (1987): Prevention of shigellosis by a *Salmonella typhi*-*Shigella sonnei* bivalent vaccine. *J. Infect. Dis.* **155**:1260-1265.
  21. Bloom, W.L., W.J. McGhee, W.J. Cromatrye, D.W. Watson (1947): Studies on infection with *Bacillus anthracis*. *J. Infect. Dis.* **80**, 137-142.
  22. Boraschi, D. und A. Tagliabue (1999): Interleukin-1 and Interleukin-1 Fragments as Vaccine Adjuvants. *Methods* **19**, 108-113.
  23. Brachman, P., A.M. Friedlander (1999): Anthrax. In: Plotkin S.A., W.A. Orenstein (eds). *Vaccines*. W.B. Saunders Philadelphia, S. 629-637.
  24. Brachman, P.S., H. Gold, S.A. Plotkin, F.R. Fekety, M. Werrin, N.R. Ingraham (1962): Field evaluation of a human anthrax vaccine. *AM. J. Public Health* **52**, 632-645.
  25. Bradley, K.A., J. Mogridge, M. Mourez, R.J. Collier, J.A.T. Young (2001): Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* **414**, 225-229.
  26. Brossier, F., M. Levy, M. Mock (2002): Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. *Infect. Immun.* **70**, 661-664.
  27. Brossier, F., M. Mock, J.C. Sirard (1999): Antigen delivery by attenuated *Bacillus anthracis*: new prospects in veterinary vaccines. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 298-302.
  28. Brossier, F., M. Weber-Levy, M. Mock, J. C. Sirard (2000): Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infect. Immun.* **68**, 1781-1786.
  29. Broster, M.G., S.E. Hibbs (1990): Protective efficacy of anthrax vaccines against aerosol challenge. *Proceedings of the International Workshop on Anthrax*, 11.-13. April 1989, Winchester, UK, Salisbury, Med. Bull. Special suppl. **68**, 91-92.
  30. Cardenas, L., J.D. Clements (1993): Stability, immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors. *Vaccine* **11**, 126-135.
  31. Cartwright, M.E., A.E. McChesney, R.L. Jones (1987): Vaccination-related anthrax in three lambs. *J Am Vet Med Assoc.* **191**, 715-716.
  32. Cataldi, A., E. Labruyere, M. Mock (1990): Construction and characterization of a protective antigen-deficient *Bacillus anthracis* strain. *Mol. Microbiol.* **4**, 1111-1117.
  33. Centers for Disease Control and Prevention (2000): Use of anthrax vaccine in the United States: recommendation of the Advisory Committee on Immunization practices (ACIP). *MMWR* 2000; 49 (No. RR-15).
  34. Chen, I., M. Pizza und R. Rappuoli (1998): Effects of the insertion of a nonapeptide from murine IL-1 $\beta$  on the immunogenicity of carrier proteins delivered by live attenuated *Salmonella*. *Arch. Microbiol.* **169**, 113-119.
  35. Chong, C., K.L. Bost, J.D. Clements (1996): Differential production of Interleukin-12 mRNA by murine macrophages in response to viable or killed *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **64**, 1154-1160.
  36. Cohen, S., I. Mendelson, Z. Altboum, D. Kobiler, E. Elhanany, T. Bino, M. Leitner, I. Inbar, H. Rosenberg, Y. Gozes, R. Barak, M. Fisher, C. Kronman, B. Velan, A. Shafferman (2000): Attenuated nontoxigenic and nonencapsulated recombinant *Bacillus anthracis* spore vaccines protect against anthrax. *Infect. Immun.* **68**, 4549-45458.
  37. Coulson, N.M., M. Fulop, R.W. Titball (1994): *Bacillus anthracis* protective antigen, expressed in *Salmonella typhimurium* SL 3261, affords protection against anthrax spore challenge. *Vaccine* **12**, 1395-1401.
  38. Curtiss III. R., R.M. Goldschmidt, N.B. Fletchall, S.M. Kelly (1988): Avirulent *Salmonella typhimurium*  $\Delta$ cyt  $\Delta$ crp oral vaccine strains expressing a streptococcal colonization and virulence antigen. *Vaccine* **6**, 155-160.
  39. Curtiss III., R., S.M. Kelly, P.A. Gulig, K. Nakayama (1989): Selective delivery of antigens by recombinant bacteria. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **146**, 35-49.

40. Curtiss, R., III. (1990): Attenuated *Salmonella* strains as live vectors for the expression of foreign antigens. In G. C. Woodrow and M. M. Levine (ed.), New generation vaccines. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., pp. 161-188.
41. Curtiss, R., III., J.O. Hassan, J. Herr, S.M. Kelly, M. Levine, G. G. Mahairas, D. Milich, D. Peterson, F. Schödel, J. Srinivasan, C. Tacket. S. A. Tinge, R. Wright (1994): Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* vaccines. In G. P. E. A. Talwar (ed.), Recombinant and synthetic vaccines. Narosa Publishing House, New Dehli, India, pp. 340-351.
42. Davis, H.L., M.L. McCluskie (1999) : DNA vaccines for viral diseases. *Microb. Infect.* **1**: 7-12.
43. Doria-Rose, N.A., N.L. Haigwood, (2003): DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. *Methods* **31**: 207-216.
44. Duesbery, N.S., G.F. Van de Woude (1999a): Anthrax toxins. *Cell Mol Life Sci.* **55**, 1599-1609.
45. Duesbery, N.S., G.F. Vande Woude (1999b): Anthrax lethal factor causes proteolytic inactivation of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 289-293.
46. Dunstan, S.J., C.P. Simmons, R.A. Stugnell (1998): Comparison of the abilities of different attenuated *Salmonella typhimurium* strains to elicit humoral immune responses against a heterologous antigen. *Infect. Immun.* **66**, 732-740.
47. Erwin, J.L., L.M. DaSilva, S. Bavari, S.F. Little, A.M. Friedlander, T.C. Chanh (2001): Macrophage-derived cell lines do not express proinflammatory cytokines after exposure to *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Infect. Immun.* **69**, 1175-1177.
48. Ezzell, J.W., Jr., T.G. Abshire (1988): Immunological analysis of cell-associated antigens of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **56**, 349-356.
49. Ezzell, J.W., Jr., T.G. Abshire, S.F. Little, B.C. Lidgerding, C. Brown (1990): Identification of *Bacillus anthracis* by using monoclonal antibody to cell wall galactose-N-acetylglucosamine polysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 223-231.
50. Ezzell, J.W., S.L. Welkos (1999): The capsule of *Bacillus anthracis*, a review. *J Appl. Microbiol.* **87**, 250.
51. Farchaus, J.W., W.J. Ribot, S. Jendrek, S.F. Little (1998): Fermentation, Purification, and Characterization of Protective Antigen From a Recombinant, Avirulent Strain of *Bacillus anthracis*. *Appl. Environm. Microbiol.* **64**, 982-991.
52. Fellows, P.F., M.K. Linscott, B.E. Ivins, M L. Pitt, C.A. Rossi, P.H. Gibbs, A.M. Friedlander (2001): Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. *Vaccine* **19**, 3241-3247.
53. Fellows, P.F., M.K. Linscott, S.F. Little, P. Gibbs, B.E. Ivins (2002): Anthrax vaccine efficacy in golden Syrian hamsters. *Vaccine* **20**, 1421-1424.
54. Finlay B.B., S. Falkow (1989): *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol. Microbiol.* **3**, 1833-1839.
55. Flick-Smith, H.C., N.J. Walker, P. Gibson, H. Bullifent, S. Hayward, J. Miller, R.W. Titball, und E.D. Williamson (2002): A recombinant carboxy-terminal domain of the protective antigen of *Bacillus anthracis* protects mice against anthrax infection. *Infect. Immun.* **70**:1653-6.
56. Friedlander, A.M. (1986): Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. *J. Biol. Chem.* **261**, 7123-7126.
57. Friedlander, A.M., R. Bhatnagar , S.H. Leppla, L. Johnson, Y. Singh (1993): Characterization of macrophage sensitivity and resistance to anthrax lethal toxin. *Infect. Immun.* **61**, 245-252.
58. Friedlander, A.M., P.R. Pittman, G.W. Parker (1999): Anthrax vaccine: evidence for safety and efficacy against inhalational anthrax. *JAMA* **282**, 2104-2106.

59. Fritz, D.L., N.K. Jaax, W.B. Lawrence, K.J. Davis, M.L. Pitt, J.W. Ezzell, A.M. Friedlander (1995): Pathology of experimental inhalation anthrax in the rhesus monkey. *Lab. Invest.* **73**, 691-702.
60. Garmory, H.S., R.W. Titball, K.F. Griffin, U. Hahn, R. Böhm, W. Beyer (2003): *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing a chromosomally integrated copy of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene protects mice against an anthrax spore challenge. *Infect. Immun.* **71**, 3831-3836.
61. Gentschev, I., H. Mollenkopf, Z. Sokolovic, J. Hess, S.H.E. Kaufmann, W. Goebel (1996): Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* haemolysin secretion pathway. *Gene* **179**, 133-140.
62. George, A. (1996): Generation of gamma interferon responses in murine Peyer's Patches following oral immunization. *Infect. Immun.* **64**, 4606-4611.
63. Gladstone, G.P. (1946): Immunity to anthrax: protective antigen present in cell-free culture filtrates. *Br. J. Exptl. Pathol.* **27**, 394-418.
64. Green, B.D., L. Battisti, T.M. Koehler, C.B. Thorne, B.E. Ivins. 1985. Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun.* **49**, 291-297.
65. Gregersen, J-P. (2001): DNA vaccines. *Naturwissenschaften* **88**: 504-513.
66. Gu, M.L., S.H. Leppla, D.M. Klinman (1999): Protection against anthrax toxin by Vakzination with a DNA plasmid encoding anthrax protective antigen. *Vaccine* **17**, 340-344.
67. Guidi-Rontani, C., M. Mock (2002): Macrophage interactions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **271**, 115-141.
68. Guidi-Rontani, C., M. Weber-Levy, E. Labruyere, M. Mock (1999): Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Mol. Microbiol.* **31**, 9-17.
69. Gupta, P., S.M. Waheed, R. Bhatnagar (1999): Expression and purification of the recombinant protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Protein Expr. Purif.* **16**, 369-376.
70. Hacker, J., J. Heesemann (2002): *Molecular Infection Biology*. In: John Wiley & Sons, Inc., 111 River Street, Hoboken, NJ 07030, USA, pp. 239-241.
71. Hahn, H.P., C. Hess, J. Gabelsberger, H. Domdey, B.U. von Specht (1998): A *Salmonella typhimurium* strain genetically engineered to secrete effectively a bioactive human interleukin (hIL)-6 via the *Escherichia coli* hemolysin secretion apparatus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **20**, 111-119.
72. Hahn, U.K., M. Alex, C.-P. Czerny, R. Böhm, W. Beyer (2004): Protection of mice against challenge with *Bacillus anthracis* STI spores after DNA Vakzination. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 35-44.
73. Hahn, U., R. Böhm, W. Beyer (2005a): DNA vaccination against anthrax in mice – combination of anti-spore and anti-toxin components. *Vaccine*, eingereicht.
74. Hahn, U., M. Aichler, R. Boehm, W. Beyer (2005b): Comparison of the immunological memory after DNA vaccination and protein vaccination against anthrax in sheep. *Vaccine*, eingereicht.
75. Hahn, U.K., W. Beyer (2004): Vergleich unterschiedlicher eukaryontischer Expressionskassetten und deren Kombination für die DNA-Vakzinierung gegen Anthrax. Poster zur Tagung der FG Bakteriologie und Mykologie der DVG, Berlin 10.-12. Juni, 2004, BMTW, **117**, 457.
76. Hanna, P.C., S. Kochi, R.J. Collier (1992): Biochemical and physiological changes induced by anthrax lethal toxin in J774 macrophage-like cells. *Mol. Biol. Cell.* **3**, 1269-1277.
77. Hanna, P.C., D. Acosta, R.J. Collier (1993): On the role of macrophages in anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10198-10201.
78. Hanna, P.C., B.A. Kruskal, R.A. Ezekowitz, B.R. Bloom, R.J. Collier (1994): Role of macrophage oxidative burst in the action of anthrax lethal toxin. *Mol. Med.* **1**, 7-18.

79. Hess, J., S.H.E. Kaufmann (1999): Live antigen carriers as tools for improved anti-tuberculosis vaccines. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **23**, 165-173.
80. Hess, J., L. Grode, I. Gentshev, J. Fensterla, G. Dietrich, W. Goebel, S.H.E. Kaufmann (2000a): Secretion of different listeriolysin cognates by recombinant attenuated *Salmonella typhimurium*: superior efficacy of haemolytic over non-haemolytic constructs after oral Vakzination. *Microbes Infect.* **2**, 1799-1806.
81. Hess, J., L. Grode, J. Hellwig, P. Conradt, I. Gentshev, W. Goebel, C. Ladel, S.H.E. Kaufmann (2000b): Protection against murine tuberculosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the 30-kDa antigen of Mycobacterium bovis BCG. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**, 283-289.
82. Hoffmaster, A.R., T. Koehler (1999a): Autogenous regulation of the *Bacillus anthracis* pag operon. *J. Bacteriol.* **181**, 4485-4492.
83. Hoffmaster, A.R., T.M. Koehler (1999b): Control of virulence gene expression in *Bacillus anthracis*. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 279-281.
84. Hopkins S.A., F. Biedergang, I.E. Corthesy-Theulaz, J.P. Kraehenbühl (2000): A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell. Microbiol.* **2**, 59-68.
85. Hormaeche, C., C.M.A. Khan (1996): Recombinant bacteria as vaccine carriers of heterologous antigens. *In: Kaufmann, S.H.E. (eds.) Concepts in Vaccine Development.* Walter de Gruyter, Berlin, pp. 327-349.
86. Iacono-Connors, L.C., S.L. Welkos, B.E. Ivins, J.M. Dalrymple (1991): Protection against anthrax with recombinant virus-expressed protective antigen in experimental animals. *Infect. Immun.* **59**, 1961-1965.
87. Ivins, B., P. Fellows, L. Pitt, J. Estep, J. Farchaus, A. Friedlander, P. Gibbs (1995): Experimental anthrax vaccines: efficacy of adjuvants combined with protective antigen against an aerosol *Bacillus anthracis* spore challenge in guinea pigs. *Vaccine* **13**, 1779-1784.
88. Ivins, B.E., J.W. Ezzell, Jr., J.Jemski, K.W. Hedlund, J.D. Ristroph, S.H. Leppla (1986): Immunization studies with attenuated strains of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **52**, 454-458.
89. Ivins, B.E., S.L. Welkos, G.B. Knudson, S.F. Little (1990): Immunization against anthrax with aromatic compound-dependent (Aro-) mutants of *Bacillus anthracis* and with recombinant strains of *Bacillus subtilis* that produce anthrax protective antigen. *Infect. Immun.* **58**, 303-308.
90. Ivins, B.E., S.L. Welkos, S.F. Little, M.H. Crumrine, G.O. Nelson (1992): Immunization against anthrax with *Bacillus anthracis* protective antigen combined with adjuvants. *Infect. Immun.* **60**, 662-668.
91. Ivins, B.E., P.F. Fellows, G.O. Nelson (1994): Efficacy of a standard human anthrax vaccine against *Bacillus anthracis* spore challenge in guinea-pigs. *Vaccine* **12**, 872-874.
92. Ivins, B.E., M.L. Pitt, P.F. Fellows, J.W. Farchaus, G.E. Benner, D.M. Waag, S.F. Little, G.W. Anderson, Jr., P.H. Gibbs, A.M. Friedlander (1998): Comparative efficacy of experimental anthrax vaccine candidates against inhalation anthrax in rhesus macaques. *Vaccine* **16**, 141-148.
93. Ivins, B.E., S.L. Welkos (1986): Cloning and expression of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene in *Bacillus subtilis*. *Infect Immun.* **54**, 537-542.
94. Ivins, B.E., S.L. Welkos (1988): Recent advances in the development of an improved, human anthrax vaccine. *Eur. J. Epidemiol.* **4**, 12-19.
95. Jones, B.D., N. Ghorri, S. Falkow (1994): *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* **180**, 15-23.

96. Jones B.D., S. Falkow (1996): Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 533-561.
97. Kallinteris, N.L., x. Lu, S. Wu, H. Hu, Y. Li, J.V. Gulfo, R.E. Humphreys, M. Xu (2003): Li-key/MHC class II epitope hybrid peptide vaccines for HIV. *Vaccine* **21**, 4128-4132.
98. Kaufmann, S.H.E., S. Sher, R. Ahmed (2002): In: *Immunology of infectious diseases*, ASM Press, Washington, DC, ISBN 1-55581-214-7, pp. 191-206.
99. Klein, F., I.A. Dearmon Jr., R.E. Lincoln, B.G. Mahlandt, A.L. Fernelius (1962): Immunological studies of anthrax. II. Levels of immunity against *Bacillus anthracis* obtained with protective antigen and live vaccine. *J. Immunol.* **88**, 15-19.
100. Klimpel, K.R., S.S. Molloy, G. Thomas, S.H. Leppla (1992): Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 10277-10281.
101. Klimpel, G.R., M. Asuncion, J. Haithcoat, D.W. Niesel (1995): Cholera toxin and *Salmonella typhimurium* induce different cytokine profiles in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **63**, 1134-1137.
102. Kobiler, D., Y. Gozes, H. Rosenberg, D. Marcus, S. Reuveny, Z. Altboum (2002): Efficiency of protection of guinea pigs against infection with *Bacillus anthracis* spores by passive immunization. *Infect. Immun.* **70**:544-550.
103. Koehler, T.M., Z. Dai, M. Kaufman-Yarbray (1994): Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO2 and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. *J. Bacteriol.* **176**, 586-595.
104. Koehler, T.M. (2002): *Bacillus anthracis* genetics and virulence gene regulation. *Curr. Top. Microb. Immunol.* **271**, 143-164.
105. Lavelle, E.C., S. Sharif, N.W. Thomas, J. Holland, S.S. Davis (1995): The importance of gastrointestinal uptake of particles in the design of oral delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **18**, 5-22.
106. Lee, V.T., O. Schneewind (1999): Type III secretion machines and the pathogenesis of enteric infections caused by *Yersinia* and *Salmonella spp.* *Immunol. Rev.* **168**, 241-255.
- 107.
108. Lee, J.S., A.G. Hadjipanayis, S.L. Welkos (2003): Venezuelan equine encephalitis virus-vectored vaccines protect mice against anthrax spore challenge. *Infect. Immun.* **71**, 1491-1496.
109. Leppla, S.H. (1982): Anthrax toxin edema factor: A bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3162-3166.
110. Lincoln, R.E., D.C. Fish (1970): Anthrax toxin. In: Montie, TC, Kadis S, Ajl SJ (eds), *Microbial Toxins*, Academic Press, New York, S. 361-414.
111. Little, S. F., G. B. Knudson (1986): Comparative efficacy of *Bacillus anthracis* live spore vaccine and protective antigen vaccine against anthrax in the guinea pig. *Infect. Immun.* **52**, 509-512.
112. Little, S.F., J.M. Novak, J.R. Lowe, S.H. Leppla, Y. Singh, K. R. Klimpel, B. C. Lidgerding, A.M. Friedlander (1996): Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibodies. *Microbiology* **142**, 707-715.
113. Little S.F., B.E. Ivins, P.F. Fellows, A.M. Fiedlander (1997): Passive protection studies against *Bacillus anthracis* infection in guinea pigs using monoclonal and polyclonal antibodies. *Infect. Immun.* **65**, 5171-5175.
114. Little, S.F., B.E. Ivins, P.F. Fellows, M.L.M. Pitt, S.L. W. Norix, G.P. Andrews (2004): Defining a serological correlate of protection in rabbits for a recombinant anthrax vaccine. *Vaccine* **22**, 422-430.

115. Liu, S., S.H. Leppla (2002): Cell surface tumor endothelium marker 8 cytoplasmic tail-independent anthrax toxin binding, proteolytic processing, oligomer formation, and internalization. *J. Biol. Chem.* **278**, 5227-5234.
116. Loleit, M., H.G. Ihlenfeld, J. Brünjes, G. Jung, B. Müller, P. Hoffmann, W.G. Bessler, M. Pierres, G. Haas (1996): Synthetic peptides coupled to the lipotriptide P<sub>3</sub>CSS induce in vivo B and T<sub>helper</sub> cell responses for HIV-1 Reverse Transcriptase. *Immunobiol.* **195**, 61-76.
117. Makino, S., I. Uchida, N. Terakado, C. Sasakawa, M. Yoshikawa (1989): Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **171**, 722-730.
118. Malaviya, R., N.J. Twosten, E.A. Ross, S.N. Abraham, J.D. Pfeifer (1996): Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells. *J. Immunol.* **156**, 1490-1496.
119. Malcherek, G., C. Wirblich, N. Willcox, H.G. Rammensee, J. Trowsdale, A. Melms (1998): *J. Immunol.* **28**, 1524-1533.
120. Marriott, I., T.G. Hammond, E.K. Thomas, K.L. Bost (1999): Salmonella efficiently enter and survive within cultured CD11c+ dendritic cells initiating cytokine expression. *Eur. J. Immunol.* **29**, 1107-1115.
121. McBride, B.W., A. Mogg, J.L. Telfer, M.S. Lever, J. Miller, P.C. Turnbull, L. Baillie (1998): Protective efficacy of a recombinant protective antigen against *Bacillus anthracis* challenge and assessment of immunological markers. *Vaccine* **16**, 810-817.
122. McGhee, J.R., J. Xu-Amano, C.J. Miller, R.J. Jackson, K. Fujihashi, H.R. Staats, H. Kiyono (1994): The common mucosal immune system: from basic principles to enteric vaccines with relevance for the female reproductive tract. *Reprod. Fertil. Dev.* **6**, 369-379.
123. Mielcarek, N., S. Alonso, C. Locht (2001): Nasal vaccination using live bacterial vectors. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **51**, 55-69.
124. Mikesell, P., B.E. Ivins, J.D. Ristroph, T.M. Dreier (1983): Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **39**, 371-376.
125. Miller, J., B.W. McBride, R.J. Manchee, P. Moore, L.W.J. Baillie (1998): Production and purification of recombinant protective antigen and protective efficacy against *Bacillus anthracis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 56-60.
126. Mitov, I., V. Denchev, K. Linde (1992): Humoral and cell-mediated immunity in mice after immunization with live oral vaccines of *Salmonella typhimurium*: auxotrophic mutants with two attenuating markers. *Vaccine* **10**, 61-66.
127. Moayeri, M., D. Haines, H.A. Young, S. Leppla (2003): *Bacillus anthracis* lethal oxin induces TNF- $\alpha$ -independent hypoxia-mediated toxicity in mice. *J. Clin. Invest.* **112**, 670-682.
128. Mollenkopf, H., G. Dietrich, S.H.E. Kaufmann (2001): Intracellular bacteria as targets and carriers for vaccination. *Biol. Chem.* **382**, 521-532.
129. Naiki, Y., H. Nishimura, T. Kawano, Y. Tanaka, S. Itohara, M. Taniguchi, Y. Yoshikai (1999): Regulatory role of peritoneal NK1.1+  $\alpha\beta$  T cells in IL-12 production during *Salmonella* infection. *J. Immunol.* **163**, 2057-2063.
130. Nassi, S., R.J. Collier, A. Finkelstein (2002): PA63 channel of anthrax toxin: an extended beta-barrel. *Biochemistry* **41**, 1445-1450.
131. Novak, J.M., M.P. Stein, S.F. Little, S.H. Leppla, A.M. Friedlander (1992): Functional characterization of protease-treated *Bacillus anthracis* protective antigen. *J. Biol. Chem.* **267**, 17186-17193.
132. Odorizzi, C.G., I.S. Trowbridge, L. Xud, C.R. Hopkins, C.D. Davis, J.F. Collawn (1994): Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J. Cell Biol.* **126**, 317-330.

133. Oh, H.B., Y.M. Park, W.K. Seong (1998): Expression and secretion of *Bacillus anthracis* protective antigen in *Bacillus brevis*. 3<sup>rd</sup> International Conference on Anthrax, Plymouth, 7-10<sup>th</sup> September, Abstract Book, p. 64.
134. Park, J.M., F.R. Greten, Z.W. Li, M. Karin (2002): Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science* **297**, 2048-2051.
135. Pasteur, L. (1881): De l'attenuation des virus et de leur retour a la virulence. *CR Acad. Sci. Agric. Bulg.* **92**, 429-435.
136. Pavlov, V.M., T.B. Kravchenko, A.N. Mokrievich (1998): Immuno-biological properties of recombinant vaccine strain of *Francisella tularensis* producing protective antigen of *Bacillus anthracis*. 3<sup>rd</sup> Int. Conf. Anthrax, Plymouth, 7.-10. Sept. 1998, p. 71.
137. Pellizzari, R., C. Guidi-Rontani, G. Vitale, M. Mock, C. Montecucco (1999): Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFN $\gamma$ -induced release of NO and TNF $\alpha$ . *FEBS Lett.* **462**, 199-204.
138. Pellizzari, R., C. Guidi-Rontani, G. Vitale, M. Mock, C. Montecucco (2000): Lethal factor of *Bacillus anthracis* cleaves the N-terminus of MAPKKs: analysis of the intracellular consequences in macrophages. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**, 421-427.
139. Petosa, C., R.J. Collier, K.R. Klimpel, S.H. Leppla, R.C. Liddington (1997): Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* **385**, 833-838.
140. Pezard, C., P. Berche, M. Mock (1991): Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **59**, 3472-3477.
141. Pezard, C., E. Duflot, M. Mock (1993): Construction of *Bacillus anthracis* mutant strains producing a single toxin component. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2459-2463.
142. Pezard, C., M. Weber, J.C. Sirard, P. Berche, M. Mock (1995): Protective immunity induced by *Bacillus anthracis* toxin-deficient strains. *Infect. Immun.* **63**, 1369-1372.
143. Pfeifer, J.D., M.J. Wick, R.L. Robert, K. Findlay, S.J. Normark, C.V. Harding (1993): Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* **361**, 359-362.
144. Pitt, M.L., S.F. Little, B.E. Ivins, P. Fellows, J. Barth, J. Hewetson, P. Gibbs, M. Dertzbaugh, A.M. Friedlander (2001): In vitro correlate of immunity in a rabbit model of inhalational anthrax. *Vaccine* **19**, 4768-4773.
145. Pitt, M.L.M., B. Ivins, J. Estep, J. Farchaus, A.M. Friedlander (1996a): Comparative efficacy of a recombinant protective antigen vaccine against inhalation anthrax in guinea pigs, rabbits, and rhesus monkeys. *Abstr. Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol, Atlanta GA* P. 278 E-70.
146. Pitt, M.L.M., B.E. Ivins, J.E. Estep, J. Farchaus, A.M. Friedlander (1996b): Comparison of the efficacy of purified protective antigen and MDPH to protect non-human primates from inhalation anthrax. *Salisbury Med. Bull.* **87**, 130.
147. Pitt, M.L.M., S.F. Little, B.E. Ivins, P.F. Fellows, J. Boles, J. Barth, J.H. Hewetson, A.M. Friedlander (1999): In vitro correlate of immunity in an animal model of inhalational anthrax. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 304.
148. Popov, S.G., R. Villasmil, J. Bernardi, E. Grene, J. Cardwell, T. Popova, A. Wu, D. Alibek, C. Bailey, K. Alibek (2002): Effect of *Bacillus anthracis* lethal toxin on human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett.* **527**, 211-215.
149. Popov, S.G., T.G. Popova, E. Grene, F. Klotz, J. Cardwell, C. Bradburne, Y. Jama, M. Maland, J. Wells, A. Nalca, T. Voss, C. Bailey, K. Alibek (2004): Systemic cytokine response in murine anthrax. *Cell. Microbiol.* **6**, 225-233.
150. Preisz, H. (1911): Quoted in Anthrax. (1955) In: Wilson GS, Miles AA (eds), Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and immunity. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 1950.

151. Price, B.M., A.L. Liner, S. Park, S.H. Leppla, A. Mateczun, D.F. Galloway (2001): Protection against anthrax lethal toxin challenge by genetic immunization with a plasmid encoding the lethal factor protein. *Infect. Immun.* **69**, 4509-4515.
152. Puziss, M., G.G. Wright (1962): Studies on immunity in anthrax. X. Gel-adsorbed protective antigen for immunization of man. *J. Bacteriol.* **85**, 230-236.
153. Puziss, M., L.C. Manning, L.W. Lynch, E. Barclay, I. Abelow, G.G. Wright (1963): Large-scale production of protective antigen of *Bacillus anthracis* anaerobic cultures. *Appl. Microbiol.* **11**, 330-334.
154. Ramarathinam, L., R.A. Shaban, D.W. Niesel, G.R. Klimpel (1991): Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) production by gut-associated lymphoid tissue and spleen following oral *Salmonella typhimurium* challenge. *Microb. Pathogen.* **11**, 347-356.
155. Ramirez, D.M., S.H. Leppla, R. Schneerson, J. Shiloach (2002): Production, recovery and immunogenicity of the protective antigen from a recombinant strain of *Bacillus anthracis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 232-238.
156. Reuveny, S., M.D. White, Y.Y. Adar, Y. Kafri, Z. Altboum, Y. Gozes, D. Kobiler, A. Shafferman, B. Velan (2001): Search for correlates of protective immunity conferred by anthrax vaccine. *Infect. Immun.* **69**, 2888-2893.
157. Rhie, G.E., M.H. Roehrl, M. Mourez, R.J. Collier, J.J. Mekalanos, J.Y. Wang (2003) : A dually active anthrax vaccine that confers protection against both bacilli and toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10925-10930.
158. Riemenschneider, J., A. Garrison, J. Geisbert, P. Jahrling, M. Hevey, D. Negley, A. Schmaljohn, J. Lee, M.K. Hart, L. Vanderzanden, D. Custer, M. Bray, A. Ruff, B. Ivins, A. Bassett, C. Rossi, C. Schmaljohn (2003): Comparison of individual and combination DNA vaccines for B. anthracis, Ebola virus, Marburg virus and Venezuelan equine encephalitis virus. *Vaccine.* **21**:4071-4080.
159. Rosovitz, M.J., P. Schuck, M. Varughese, A.P. Chopra, V. Mehra, Y. Singh, L.M. McGinnis, S.H. Leppla (2003): Alanine-scanning mutations in domain 4 of anthrax toxin protective antigen reveal residues important for binding to the cellular receptor and to a neutralizing monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **278**, 30936-30944.
160. Salsbery, C.E. (1926): Anthrax aggressin. *J. Am. Vet. Med. Assn.* **68**, 755-772.
161. Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Lab. Press. 2nd edition.
162. Sanderson, S., K. Frauwirth, N. Shastri (1995): Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7217-7221.
163. Scherer, C.A., E. Cooper, S.I. Miller (2000): The Salmonella type III secretion translocon protein SspC is inserted into the epithelial cell plasma membrane upon infection. *Mol. Microbiol.* **37**, 1133-1145.
164. Schild, H.K. Deres, K.H. Wiesmüller, G. Jung, H.G. Rammensee (1991): Efficiency of peptides and lipopeptides for in vivo priming of virus specific cytotoxic T cells. *Eur. J. Immunol.* **21**, 2649-2654.
165. Schlecht, S., K.H. Wiesmüller, G. Jung, W.G. Bessler (1989): Enhancement of protection against *Salmonella* infection in mice mediated by a synthetic lipopeptide analogue of bacterial lipoprotein in *S. typhimurium* vaccines. *Zbl. Bakt.* **271**, 493-500.
166. Schneerson, R., J. Kubler-Kielb, T.Y. Liu, Z.D. Dai, S.H. Leppla, A. Yergey, P. Backlund, J. Shiloach, F. Majadly, J.B. Robbins (2003): Poly( $\gamma$ -D-glutamic acid) protein conjugates induce IgG antibodies in mice to the capsule of *Bacillus anthracis*: A potential addition to the anthrax vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8945-8950.
167. Scobie, H.M., G.J. Rainey, K.A. Bradley, J.A. Young (2003): Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5170-5174.

168. Shlyakhov, E.N., E. Rubinstein (1994): Human live anthrax vaccine in the former USSR. *Vaccine* **12**, 727-730.
169. Shuyalak, V. P. (1970)( in Russian): The epidemiologic effectiveness of anthrax STI vaccine in the Tadzhik SSR. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* **47**, 117-120.
170. Singh, Y., S.H. Leppla, R. Bhatnagar, A.M. Friedlander (1989): Internalization and processing of *Bacillus anthracis* lethal toxin by toxin-sensitive and -resistant cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 11099-11102.
171. Singh, Y., K.R. Klimpel, C.P. Quinn, V.K. Chaudhary, S.H. Leppla (1991): The carboxyl-terminal end of protective antigen is required for receptor binding and anthrax toxin activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 15493-1547.
172. Singh, Y., B.E. Ivins, S.H. Leppla (1998): Study of immunization against anthrax with the purified recombinant protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun.* **66**, 3447-3448.
173. Singh, Y., K.R. Klimpel, S. Goel, P. K. Swain, S.H. Leppla (1999): Oligomerization of anthrax toxin protective antigen and binding of lethal factor during endocytic uptake into mammalian cells. *Infect. Immun.* **67**, 1853-1859.
174. Sirisanthana, T., K.E. Nelson, J.W. Ezzell, T.G. Abshire (1988): Serological studies of patients with cutaneous and oral-oropharyngeal anthrax from northern Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39**, 575-581.
175. Smith, H., J. Keppie (1954): Observations on experimental anthrax: Demonstration of a specific lethal factor produced in vivo by *Bacillus anthracis*. *Nature* **173**, 869-870.
176. Smith H., H. Stoner (1967): Anthrax toxic complex. *Fed. Proc.* **26**, 1554-1557.
177. Sponaas, A.M., C. Carstens, N. Koch (1999): C-terminal extension of the MHC class II-associated invariant chain by an antigenic sequence triggers activation of naive T cells. *Gene Therapy* **6**, 1826-1834.
178. Steichen, C., P. Chen, J.F. Kearney, C.L. Turnbough, Jr. (2003): Identification of the immunodominant protein and other proteins of the *Bacillus anthracis* exosporium. *J. Bacteriol.* **185**, 1903-1910.
179. Stepanov, A.V., L.I. Marinin, A.P. Pomeransev, N.A. Staritsin (1996): Development of novel vaccines against anthrax in man. *J. Biotechn.* **44**:155-150.
180. Sterne, M. (1937): The effects of different carbon dioxide concentrations on the growth of virulent anthrax strains. Pathogenicity and immunity tests on guinea-pigs and sheep with anthrax variants derived from virulent strains. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.* **9**, 49-67.
181. Sterne, M. (1939): The use of anthrax vaccines prepared from avirulent (unencapsulated) variants of *Bacillus anthracis*. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.* **13**, 307-312.
182. Sterne, M., J. Nichol, N.S. Lambrechts (1942): The effect of large-scale active immunization against anthrax. *J. S. African Med. Assoc.* **13**, 53-63.
183. Svensson, M., B. Stockinger, M.J. Wick (1997): Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J. Immunol.* **158**, 4229-4236.
184. Sylvestre, P., E. Couture-Tosi, M. Mock (2002): A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Mol. Microbiol.* **45**, 169-178.
185. Sylvestre, P., E. Couture-Tosi, M. Mock (2003): Polymorphism in the collagen-like region of the *Bacillus anthracis* BclA protein leads to variation in exosporium filament length. *J. Bacteriol.* **185**, 1555-1563.
186. Thatte, J., S. Rath, V. Bal (1993): Immunization with live versus killed *Salmonella typhimurium* leads to the generation of an IFN- $\gamma$ -dominant versus an IL-4-dominant immune response. *Int. Immunol.* **5**, 1431-1436.

187. Thwaite, J., K. Stephenson, Z. Pragai, C.R. Harwood, L.W.J. Baillie, P.T. Emmerson (1998): Optimising the production of *Bacillus anthracis* protective antigen by *Bacillus subtilis*. 3<sup>rd</sup> International Conference on Anthrax, Plymouth, 7-10<sup>th</sup> September, Abstract Book, p. 85.
188. Tigertt, W.D. (1980): Anthrax. William Smith Greenfield, MD FRCP, Concerning the priority due to him for the production of the first vaccine against anthrax. *J. Hyg.* **85**, 415-420.
189. Tramont, E.C., R. Chung, S. Berman, D. Keren, C. Kapfer und S.B. Formal (1984): Safety and antigenicity of typhoid-Shigella sonnei vaccine (strain 5076-1C). *J. Infect. Dis.* **149**:133-136.
190. Turnbull, P. C., M.G. Broster, J.A. Carman, R.J. Manchee, J. Melling (1986): Development of antibodies to protective antigen and lethal factor components of anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. *Infect. Immun.* **52**, 356-363.
191. Turnbull, P.C., S.H. Leppla, M.G. Broster, C.P. Quinn, J. Melling (1988): Antibodies to anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **177**, 293-303.
192. Turnbull, P.C.B., C.P. Quinn, R. Hewson, M.C. Stockbridge, J. Melling (1990): Protection conferred by microbially-supplemented UK and purified PA vaccines. Proceedings of the Int. Workshop on Anthrax, 11-13. April, 1989, Winchester, UK, Salisbury Med. Bull., Special suppl. **68**, 89-91.
- 193.
194. Turnbull, P. C. (1991): Anthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine* **9**:533-539.
195. Turnbull, P.C.B. (2000): Current status of immunization against anthrax: old vaccines may be here to stay for a while. *Current Opinion in Infectious Diseases* **13**, 113-120.
196. Turnbull, P., K. Fowler, L. Baillie (2001): Orally administered live spore vaccines fail to induce immunity against anthrax. Abstract book, 4<sup>th</sup> Int. Confer. Anthrax, June 10.-13., Annapolis, USA, p. 25.
197. Uchida, I., J.M. Hornung, C.B. Thorne, K.R. Klimpel, S.H. Leppla (1993): Cloning and characterization of a gene whose product is a trans-activator of anthrax toxin synthesis. *J. Bacteriol.* **175**, 5329-5338.
198. VanCott, J.L., H.F. Staats, D.W. Pascual, M. Roberts, S.N. Chatfield, M. Yamamoto, M. Coste, P.B. Carter, H. Kiyono, J.R. McGhee (1996): Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subsets, macrophages and derived cytokines following oral immunization with live recombinant *Salmonella*. *J. Immunol.* **156**, 1504-1514.
199. Varughese, M., A.V. Teixeira, S. Liu, S.H. Leppla (1999): Identification of a receptor-binding region within domain 4 of the protective antigen component of anthrax toxin. *Infect. Immun.* **67**, 1860-1865.
200. Vasconcelos, D., R. Barnewall, M. Babin, R. Hunt, J. Estep, C. Nielsen, R. Carnes, J. Carney (2003): Pathology of inhalation anthrax in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Lab. Investig.* **83**, 1201-1209.
201. Verma, N. K., H. K. Ziegler, M. Wilson, M. Khan, S. Safley, B. A. D. Stocker, and G. K. Schoolnik (1995): Delivery of class I and class II MHC-restricted T-cell epitopes of listeriolysin of *Listeria monocytogenes* by attenuated *Salmonella*. *Vaccine* **13**, 142-150.
202. Vitale, G., L. Bernardi, G. Napolitani, M. Mock, C. Montecucco (2000): Susceptibility of mitogen-activated protein kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochem. J.* **352**, 739-745.
203. Vitale, G., R. Pellizzari, C. Recchi, G. Napolitani, M. Mock, C. Montecucco (1999): Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKS and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKS in cultured macrophages. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 288.

204. Vodkin, M.H., S.H. Leppla (1983): Cloning of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *Cell* **34**, 693-697.
205. Weiss, S.W., S. Krusch (2001): Bacteria-mediated transfer of eukaryotic expression plasmids into mammalian host cells. *Biol. Chem.* **382**, 533-541.
206. Welkos, S.L., A.M. Friedlander (1988): Pathogenesis and genetic control of resistance to the Sterne strain of *Bacillus anthracis*. *Microb. Pathog.* **4**, 53-69.
207. Welkos, S.L., J.R. Lowe, F. Eden-McCutchan, M. Vodkin, S.H. Leppla, J.J. Schmidt (1988): Sequence and analysis of the DNA encoding protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Gene* **69**, 287-300.
208. Welkos, S., D. Becker, A. Friedlander, R. Trotter (1990): Pathogenesis and host resistance to *Bacillus anthracis*: a mouse model. Proceedings of the Int. Workshop on Anthrax, 11-13. April, 1989, Winchester, UK, Salisbury Med. Bull., Special suppl. **68**, 49-52.
209. Welkos, S., S. Little, A. Friedlander, D. Fritz, P. Fellows (2001): The role of antibodies to *Bacillus anthracis* and anthrax toxin components in inhibiting the early stages of infection by anthrax spores. *Microbiology-Sgm.* **147**, 1677-1685.
210. Welkos, S., A. Friedlander, S. Weeks, S. Little, I. Mendelson (2002): In-vitro characterisation of the phagocytosis and fate of anthrax spores in macrophages and the effects of anti-PA antibody. *J. Med. Microbiol.* **51**, 821-831.
211. Wiesmüller K.H., G. Jung, G. Hess (1989): Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth-disease containing a potent B-cell and macrophage activator. *Vaccine* **7**, 29-34.
212. Winstanley, C., A. Hart (2001): Type III secretion systems and pathogenicity islands. *J. Med. Microbiol.* **50**, 116-126.
213. Worsham, P.L., M.R. Sowers (1999): Isolation of an asporogenic (spoOA) protective antigen-producing strain of *Bacillus anthracis*. *Can. J. Microbiol.* **45**, 1-8.
214. Wright, G.G., T. Green, R. Kanode Jr. (1954): Studies on immunity in anthrax. V. Immunizing activity of alum-precipitated protective antigen. *J. Immunol.* **73**, 387-391.
215. Wu, T.C., F.G. Guarnieri, K.F. Staveley-O'Carroll, R.P. Viscidi, H.I. Levitsky, L. Hedrick, K.R. Cho, J.T. August, D.M. Pardoll (1995): Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11671-11675.
216. Yrlid, U., M. Svensson, C. Hohansson, M.J. Wick (2000): *Salmonella* infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**, 313-320.
217. Zaucha, G.M., M.L.M. Pitt, J. Estep, B.E. Ivins, A.M. Friedlander (1998): The pathology of experimental anthrax in rabbits exposed by inhalation and subcutaneous inoculation. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **122**, 982-992.
218. Zegers, N.D., E. Kluter, H. van Der Stap, E. van Dura, P. van Dalen, M. Shaw, L. Baillie (1999): Expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* by *Lactobacillus casei*: towards the development of an oral vaccine against anthrax. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 309-314.

## **Danksagung**

Die hier vorgestellten experimentellen Daten wurden im Rahmen von zwei durch das BMVG geförderten Forschungsprojekten (E/B14E/Y0026/Y5800 und I 1200-V-4802) über einen Zeitraum von ca. 5 Jahren erarbeitet. Die Ergebnisse beruhen auf der Erstellung und Auswertung vieler Tausend Einzeldaten, ein Arbeitspensum, das selbstverständlich nur im Zusammenwirken einer größeren Arbeitsgruppe zu leisten war. Darüber hinaus war für die erfolgreiche Arbeit sowohl der wissenschaftliche Kontakt, als auch projektbezogene Kooperationen mit vielen nationalen und internationalen Kolleginnen und Kollegen notwendig. Daraus wird verständlich, daß die vorgelegte Experimentalarbeit nur auf einer breiten Basis von Mitarbeit, Hilfe und Unterstützung möglich war. Es erscheint beinahe unmöglich, ausnahmslos jedem, der daran mitgewirkt hat, in gebührender Weise gerecht danken zu können. Insofern bitte ich all jene, die ihren Namen im folgenden nicht ausdrücklich erwähnt sehen, dies nicht als Geringschätzung zu empfinden.

Für das erfolgreiche Arbeiten einer experimentellen Arbeitsgruppe sind die lokalen Arbeitsbedingungen von grundlegender Bedeutung. Dazu gehört sowohl die Möglichkeit, die notwendigen materiell-technischen Voraussetzungen schaffen zu können, als insbesondere auch die Freiheit, eigene Ideen verwirklichen zu dürfen. Ich bin daher dem Leiter des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene, Herrn Prof. Dr. R. Böhm, äußerst dankbar, eben diese Bedingungen an seinem Institut vorgefunden zu haben. Im Rahmen des möglichen, weil durch vielerlei äußere Zwänge limitierten, Spielraums wurde mir durch Prof. Böhm die größtmögliche Freiheit geboten, eigene Ideen in Forschungsprojekte zu verwandeln. Dabei konnte ich mir seiner Unterstützung in jeder Phase der Verwirklichung eines Projekts gewiß sein. Dafür nochmals herzlichen Dank.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, von denen einige für einen begrenzten Zeitraum und andere über die gesamte Zeit zum Team gehörten. Letztere wurden über die Arbeit hinaus zu echten „Weggefährten“. Meine freundschaftliche Dankbarkeit gilt den technischen Mitarbeiterinnen, Frau S. Hoche und Frau E. Blaschke für ihre zum Teil aufopferungsvolle und stets hoch fachkompetente Mitarbeit.

Ein besonderer Dank gehört Frau Dr. U. Hahn. Ihr Hinzukommen im Jahr 2001 führte zu einer deutlichen Steigerung der Effektivität der Arbeitsgruppe. Frau Hahn hat einen großen Anteil an der Erstellung, Auswertung und Darstellung von tierexperimentellen Daten. Besonders aber war sie für mich die entscheidende Gesprächspartnerin in der Planung von Versuchen und der Interpretation der Ergebnisse. Ihr Anteil an den Ergebnissen wird durch die hier zitierten Publikationen belegt.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern, die im Rahmen ihrer zeitlich begrenzten Zugehörigkeit zur Arbeitsgruppe ihr Bestmögliches zum Gelingen beigetragen haben. Dazu zählt Herr M. Beller, der als technischer Assistent insbesondere proteinchemische und zellkulturelle Arbeiten durchzuführen hatte. Desweiteren gehören dazu unsere Diplomanden, Frau M. Aichler, die für die Immunisierung der Schafe zuständig war, Frau Chr. Tsambi, die serologische Arbeiten übernommen hatte und Herr Chr. Konradt, der für einen Teil der Untersuchungen mit rekombinanten Salmonellen zuständig war.

Schließlich gilt mein Dank ausnahmslos auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts, die für die wissenschaftliche und technische Unterstützung stehen, ohne die eine kleine Arbeitsgruppe nicht existieren könnte.

Wie bereits erwähnt, bildet der wissenschaftliche Austausch und die Kooperation mit Kollegen aus aller Welt das zweite Fundament der Arbeit. Aufgrund der Vielzahl der Kontakte sind hier namentliche Nennungen nur noch eingeschränkt möglich. Wie sonst in Publikationen üblich möchte ich daher auf die angefügte Liste verweisen, in der die kooperierenden Institutionen und Partner aufgeführt werden. Ein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter des Instituts für Mikrobiologie des BMVg, stellvertretend an PD Dr. R. Grunow und PD Dr. H. Neubauer, für ihre langjährige Unterstützung bei der Planung und Finanzierung von Forschungsprojekten sowie bei der Diskussion von Ergebnissen.

In diesem Sinne geht mein Dank auch an die verantwortlichen Mitarbeiter des Sanitätsamtes der Bundeswehr.

Abschließend möchte ich mich nochmals bei allen, die mich geistig, materiell, technisch und nicht zuletzt kollegial unterstützt haben, herzlich bedanken. Mit vielen von Ihnen verbindet mich nach wie vor die laufende Arbeit. Ich wünsche uns allen viel Erfolg.

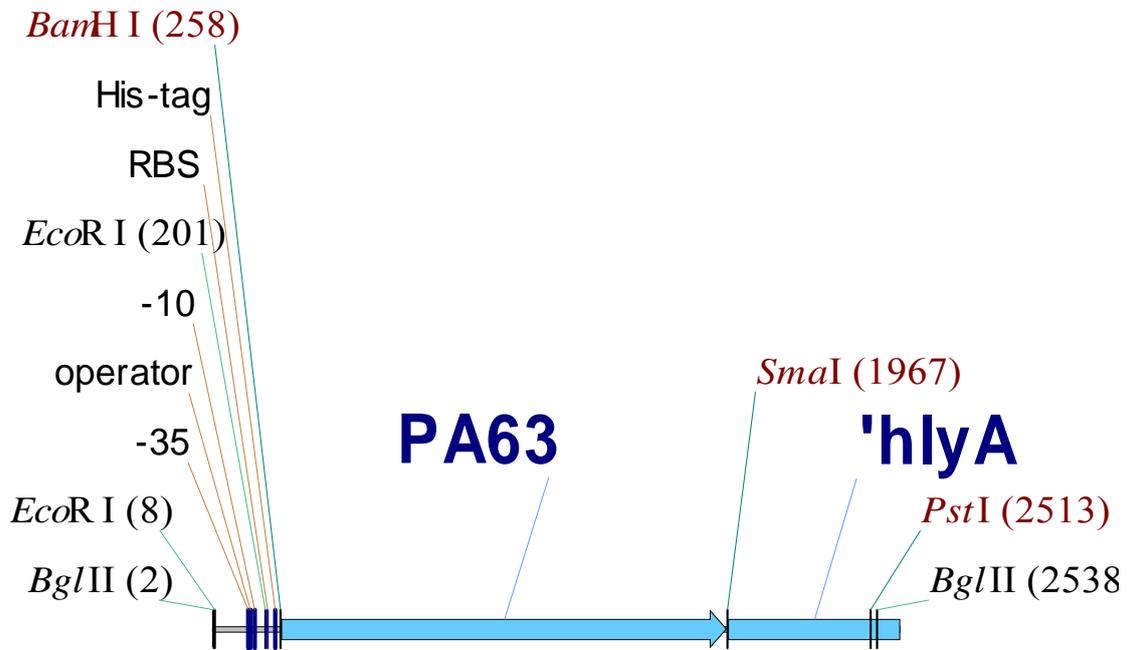
Lassen Sie uns auch weiterhin versuchen, ein nützlicher Teil des Ganzen zu sein.

Liste der Kooperationspartner:

- Company Vical, USA
- DSTL, Porton Down, U.K. (R. Titball, D. Williamson)
- Institut Pasteur, Paris (M. Mock)
- Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München (R. Grunow, H. Neubauer)
- Instituto Veneto di Medicina Molecolare, Italien (C. Montecucco)
- Instituto Zooprofilattico Sperimentale Puglia Basilicata, Italien (A. Fasanella)
- Max v. Pettenkofer Inst., München (H. Rüssmann)
- MPI für Infektionsbiologie, Berlin (S. Kauffmann, A. Ozin)
- Natl. Institute for Biological Standards and Control, U.K. (S. Rijpkema)
- Naval Medical Research Center, USA (D. Galloway, P. Turnbull)
- Public Health Agency, Porton Down, U.K. (M. Hudson)
- Univ. Scranton, Inst. Mol. Biol. Med., USA (V. DelVecchio, G. Patra)
- WIS, Munster (B. Niederwöhrmeier)

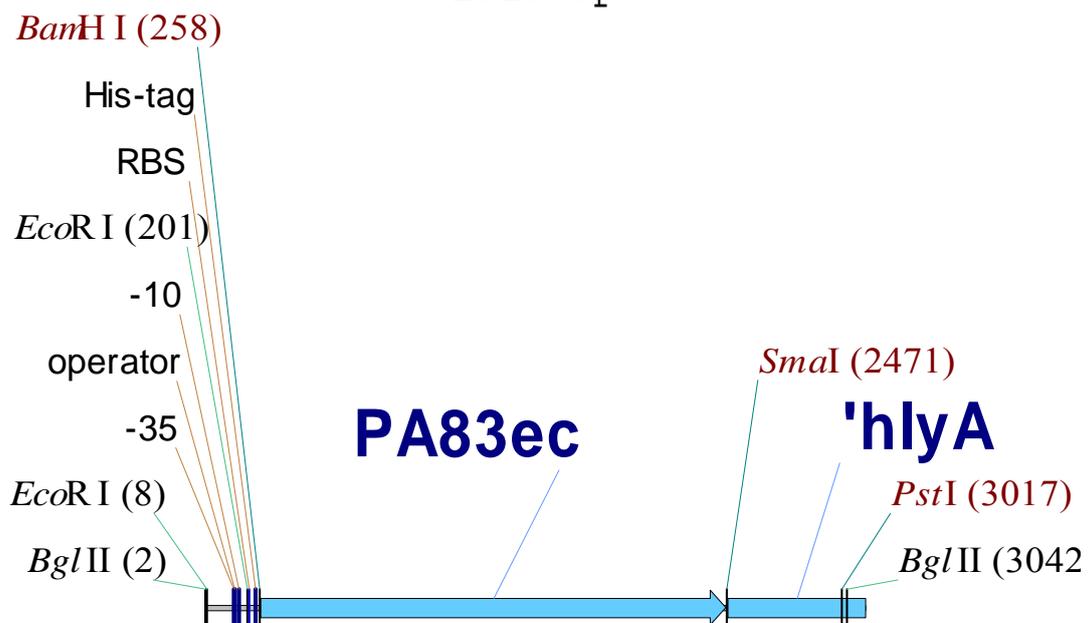
## Anhang

Die Abbildungen zeigen schematisch die im Text beschriebenen pro- und eukaryontischen Expressionskassetten. Die Schemata sind Ableitungen aus der entsprechenden Sequenz und im Programm VectorNTI Suite 8, InforMax Inc., direkt mit dieser verknüpft.



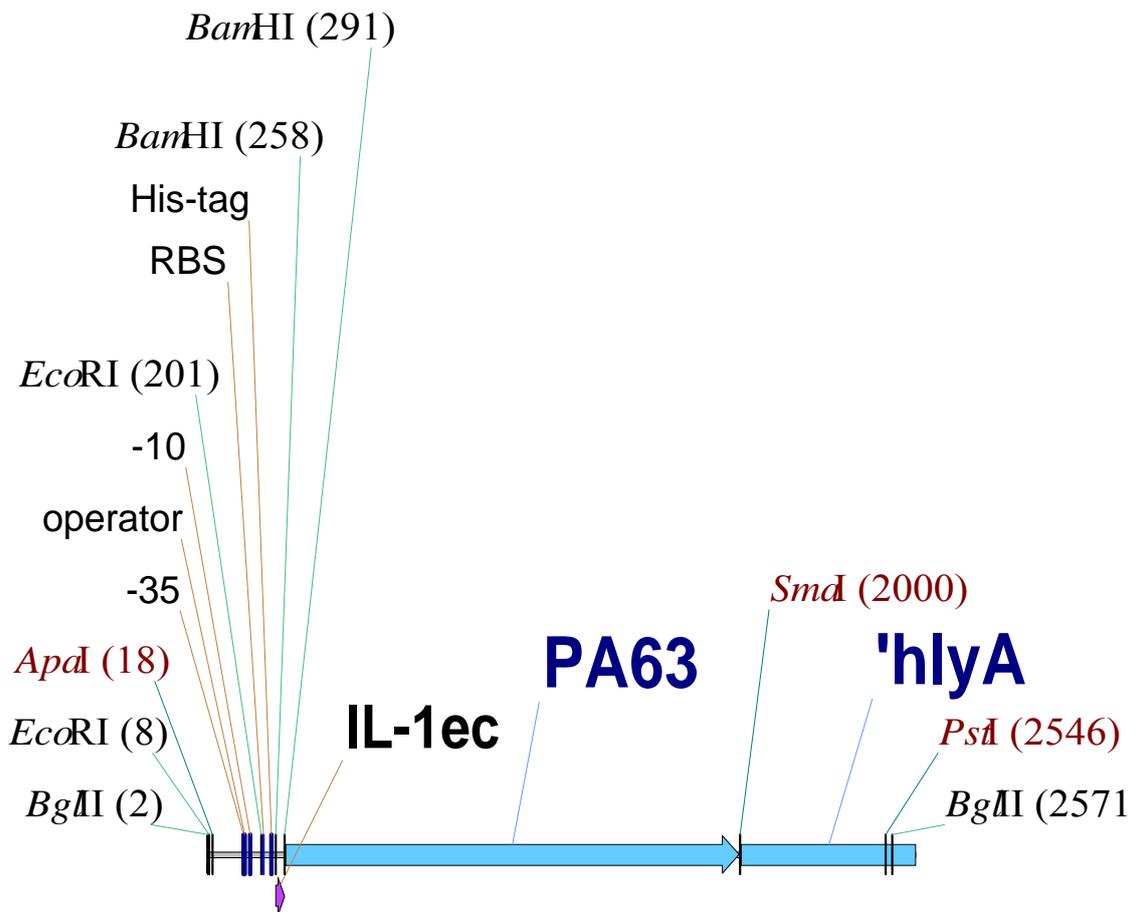
### PA63ec Xho/Sma - 'hlyA fusion

2626 bp



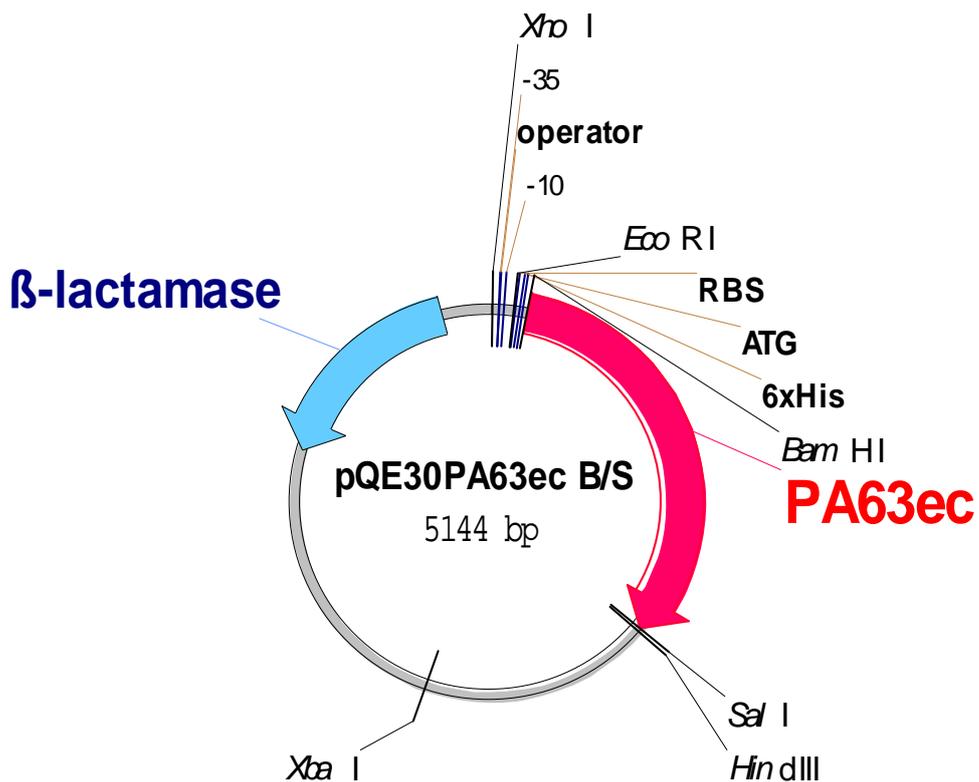
### PA83ecXho/Sma - 'hlyA fusion

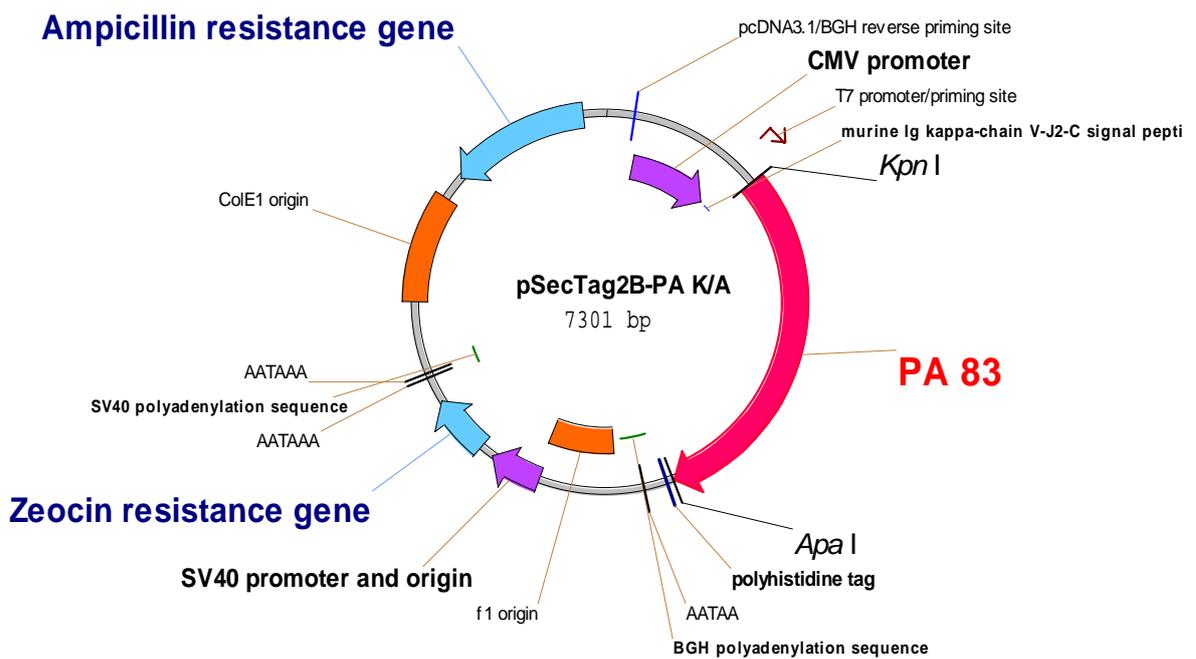
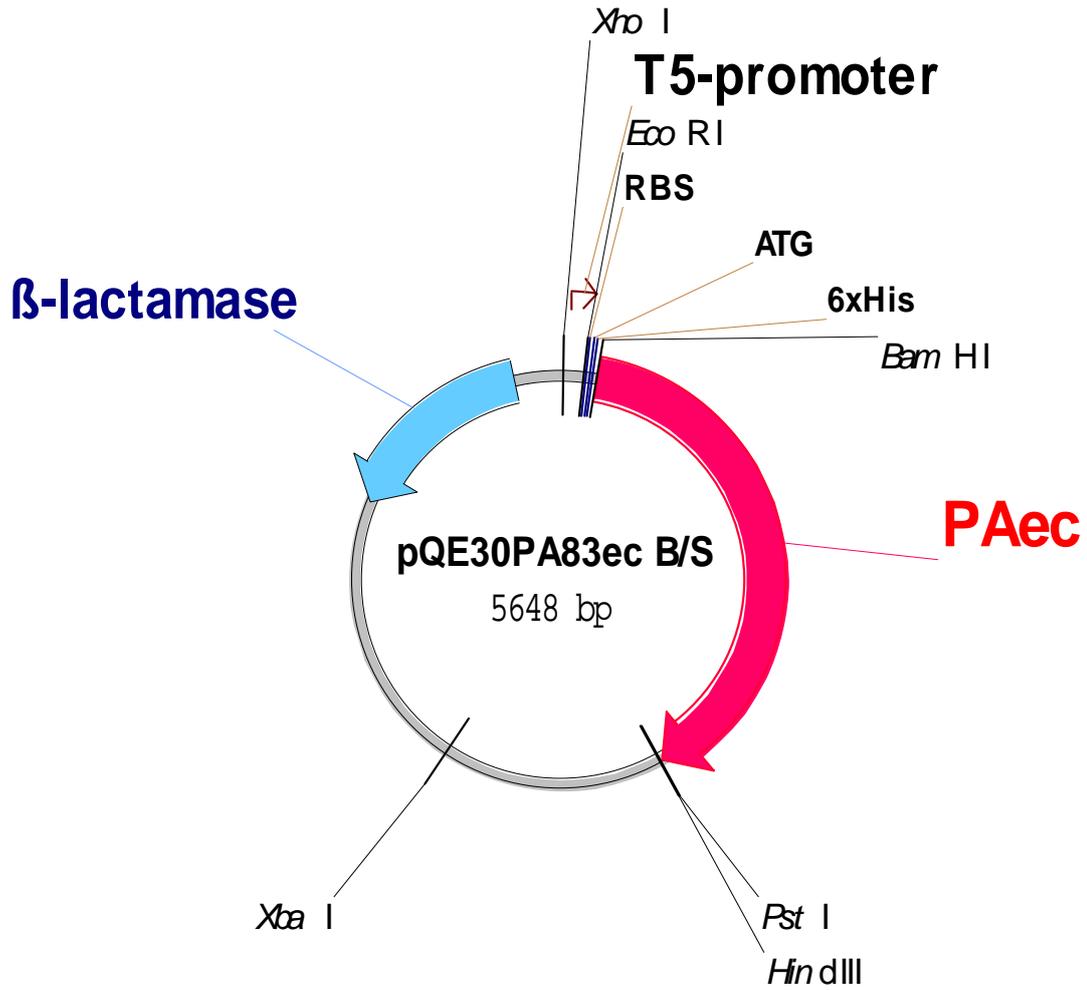
3130 bp



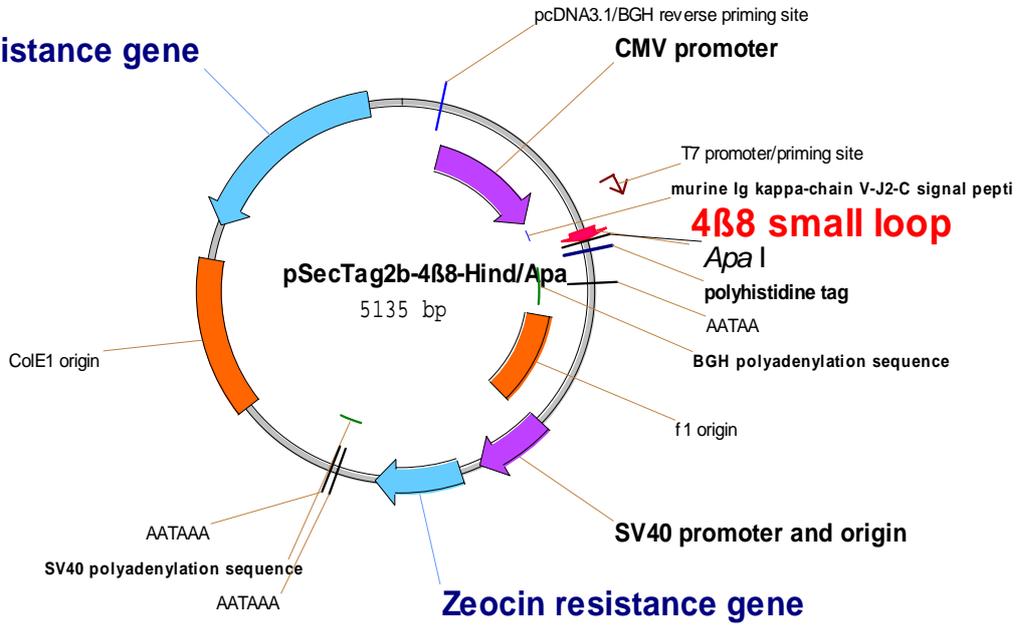
### PA63ec IL-1ec - 'hlyA fusion

2659 bp





**Ampicillin resistance gene**



**Ampicillin resistance gene**

