

Inhaltsverzeichnis

Herbstsymposium 2003

Moderne Methoden der Impfstoffentwicklung: Möglichkeiten und Grenzen

Martin Beer und Thomas C. Mettenleiter

*Bundeforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Friedrich-Loeffler-Institute,
Boddenblick 5a, 17493 Greifswald – Insel Riems*

Anwendungsmöglichkeiten der Funktionellen Genomanalyse in der Mikrobiologie

Uwe Völker, *Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Medizinische Fakultät, AG Funktionelle
Genomforschung, Walther-Rathenau-Str. 49A, 17489 Greifswald, e-mail:
voelker@unigreifswald.de*

Bridging the Gap – Organisation der Vakzineforschung in Deutschland:

Vakzine Projekt Management GmbH

Möglichkeiten des Einsatzes aktueller Methoden zur Proteinanalyse bei der Tierimpfstoffentwicklung.

Gerald-F. Gerlach, *Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin,
Tierärztliche Hochschule Hannover*

Was leisten 'Genomics' und 'Proteomics' bei der Identifizierung parasitenspezifischer Stoffwechselwege und neuer Zielstrukturen?

Klaus Lingelbach

Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

Praktischer Einsatz molekular biologischer Technologien in der Impfstoffentwicklung in der Veterinärmedizin

D. Lütticken

Intervet International bv, P.O. Box 31, 5830 AA Boxmeer, The Netherlands

Moderne Methoden der Impfstoffentwicklung: Möglichkeiten und Grenzen

Martin Beer und Thomas C. Mettenleiter

Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Friedrich-Loeffler-Institute,
Boddenblick 5a, 17493 Greifswald – Insel Riems

Impfung stellt insbesondere bei viralen Erregern eine sehr effektive Möglichkeit des Infektionsschutzes dar. Derzeit werden in der Regel konventionelle Präparationen in Form von „Lebend-“ oder „Totimpfstoffen“ angewendet. Für einige Tierseuchen stehen allerdings bisher keine ausreichend wirksamen und unschädlichen Impfstoffe zur Verfügung oder die verwendeten Vakzinen besitzen Nachteile, die eine Weiterentwicklung notwendig machen. Eine zentrale Rolle bei der Entwicklung solcher neuen, modernen Impfstoffe spielt die Gentechnologie. Mehrere Arten dieser gentechnisch modifizierten Vakzinen werden derzeit experimentell getestet: 1. *subunit* oder Spaltimpfstoffe, 2. DNA/RNA Vakzinen, 3. Vector Vakzinen, 4. *defective in second cycle* Impfstoffe (DISC; z. B. auf Replikons oder Amplikons basierend) sowie 5. rekombinante Lebendvakzinen (z. B. chimäre Viren, Deletionsmutanten, *Bacterial Artificial Chromosomes* = BAC). Gentechnische Veränderungen der Erreger wie genetische Insertionen, Deletionen oder Modifikationen können auch als Marker für die Differenzierung geimpfter von infizierten Tieren genutzt werden. Dieses auch als DIVA (*differentiating infected from vaccinated animals*) bezeichnete Prinzip spielt insbesondere bei der Tierseuchenbekämpfung eine zunehmende Rolle. Wichtige Vertreter dieser neuen Generation von Impfstoffen, z. B. zum Schutz vor Herpesviren (PRV, MDV, BHV-1), Pestivirus-Infektionen (CSF, BVD), Maul- und Klauenseuche, oder Geflügelpest sollen vorgestellt, und neue Technologien wie *small interfering RNA* (siRNA) und die Analyse von Proteinexpressionsmustern in Zellen (*Proteomics*) kurz besprochen werden.

Abschließend werden die Grenzen moderner Impfstoffentwicklung z.B. aufgrund von nationalen und internationalen Zulassungsbeschränkungen diskutiert.

Anwendungsmöglichkeiten der Funktionellen Genomanalyse in der Mikrobiologie

Uwe Völker, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Medizinische Fakultät, AG Funktionelle Genomforschung, Walther-Rathenau-Str. 49A, 17489 Greifswald, e-mail: voelker@uni-greifswald.de

Mit der Entschlüsselung des ersten bakteriellen Genoms hat 1995 eine neue Ära der biologischen Forschung begonnen, da mit der Genomsequenz erstmals der komplette Bauplan einer Zelle vorlag (Fleischmann et al., 1995). In den wenigen Jahren seit 1995 hat sich dieses Feld stürmisch entwickelt, so dass inzwischen die Genome von mehr als 300 Organismen entweder bestimmt sind oder gerade sequenziert werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/index.html>). Die anfallenden Daten speist man in rasch anwachsende DNA- und Proteindatenbanken ein, die damit einen enormen Wissensfundus darstellen. In einem ersten Schritt werden neue Genomsequenzen zunächst mit diesen Datenbanken verglichen, um durch offensichtliche Strukturähnlichkeiten einer möglichst großen Zahl vorhergesagter Gene eine vorläufige Funktion zuzuweisen. Für viele Gene bleibt dieser Ansatz jedoch erfolglos. Selbst in gut untersuchten Modellorganismen wie dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* kodieren fast 40 Prozent der 4100 Gene für Produkte, die mit Datenbanken keine Ähnlichkeiten aufweisen oder für die noch keine funktionellen Untersuchungen vorgenommen wurden.

Es ist Aufgabe der funktionellen Genomanalyse herauszufinden, wann und wo diese Gene exprimiert werden, wie sie in das funktionelle und regulatorische Netzwerk der Zelle eingebunden sind und wie ihre Produkte in Proteinkomplexen miteinander agieren. Diese Aufgabe ist nur mit globalen Analysemethoden wie beispielsweise der Transkriptionsanalyse mit DNA-Arrays oder der Bestimmung des Proteinprofils von Zellen durch Proteomanalysen zu bewältigen.

Im Vortrag soll skizziert werden, welchen Beitrag die Funktionelle Genomanalyse zur Aufklärung der Funktion ganzer Zellen leisten kann. Gerade bakterielle Systeme bieten hier durch ihren einfachen, einzelligen Aufbau die realistische Chance, die Funktion einer Zelle umfassend zu begreifen und vielleicht sogar modellieren zu können. Besonders aussichtsreich erscheint die Analyse für ausgewählte Modellorganismen wie *B. subtilis*, da man mit molekulargenetischen Methoden ausgewählte Gene einfach zerstören und die resultierenden Mutanten dann mit dem unveränderten Bakterium vergleichen kann. Im Vortrag wird am Beispiel der Stressadaptation aufgezeigt, wie man mit Hilfe der Funktionellen Genomanalyse zu einem besseren Verständnis der Bakterienphysiologie gelangen kann (Hecker and Völker, 2001).

Die Funktionelle Genomanalyse ist jedoch über die Grenzen der Grundlagenforschung hinaus von Bedeutung. Beispielsweise können genomweite Analysen von Wirt-Pathogen-Interaktionen und die Identifizierung neuer Pathogenitätsfaktoren mögliche neue Strategien für die Bekämpfung von Infektionskrankheiten aufzeigen oder Methoden der Funktionellen Genomanalyse eine bisher nie dagewesene Sicht auf das Krankheitsgeschehen und seine molekularen Ursachen ermöglichen, so dass entscheidende neue Impulse gerade auf dem Gebiet der Frühdiagnostik und Therapie einer Vielzahl von Krankheiten zu erwarten sind. Dieses Methodenarsenal ist deshalb heute integraler Bestandteil sowohl der Grundlagen- als auch der krankheitsbezogenen angewandten Forschung.

Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269, 496-512.
Hecker, M., and Völker, U. (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 44, 35-91.

Bridging the Gap – Organisation der Vakzineforschung in Deutschland:

Vakzine Projekt Management GmbH

Die Vakzine Projekt Management GmbH

- finanziert und organisiert** bundesweit die Entwicklung von Human- und Veterinärimpfstoffen aus dem Forschungsstadium bis zum klinischen „proof of concept“ und *verkauft* die Ergebnisse
- koordiniert und kooperiert** mit Partnern auf der gesamten Prozeßkette zwischen Labor und Zulassung und formt aus diesen Kooperationen ein Konsortium für Impfstoffentwicklung
- und bildet** damit eine Brücke zwischen anwendungsorientierter staatlich geförderter Forschung und der Impfstoff- und Pharmaindustrie, ein in Deutschland bislang einzigartiges Projekt des BMBF zur Erfindungsverwertung mit dem konkreten Auftrag der Stärkung Deutschlands als Standort für Impfstoffentwicklung

VPM wurde am 1. August 2002 mit Sitz in Braunschweig gegründet. Hauptgesellschafter sind die „Deutsche Stiftung Impfstoffforschung“ und der Förderverein der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF). Ein Stiftungskuratorium aus hochrangigen Vertretern von Wissenschaft, Wirtschaft, Banken und Politik steht der Firma beratend zur Seite. Geschäftsgrundlage ist das Vorhaben „Förderung einer Initiative zur Entwicklung und Verwertung von Impfstoffen“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF).

Unternehmensziel ist der Aufbau eines medizinisch und wirtschaftlich attraktiven Portfolios, um daraus zum Ende der fünfjährigen Projektlaufzeit auf eigenen unternehmerischen Füßen zu stehen. VPM möchte ein in der Impfstoffszene anerkannter Management-Partner werden, der Forschungsergebnisse effizient in praktische Anwendung überführt. Das Unternehmen will sich als attraktiver Partner auch für Investoren beweisen, die – staatlich oder privatwirtschaftlich – in die Entwicklung vorbeugender oder therapeutischer Impfstoffe ebenso investieren wollen wie in die Diagnostik und neue Technologieplattformen, zum Beispiel innovative galenische Formen und Adjuvantien, im Bereich der Human- oder der Veterinär Anwendungen.

Kontakt

Vakzine Projekt Management GmbH
Dr. Albrecht Läufer (Geschäftsführer)
Inhoffenstr. 7
D-38124 Braunschweig
Tel.: +49 (0) 531.28504-0
Fax: +49 (0) 531.28504-29
email: laeufer@vakzine-manager.de
www.vakzine-manager.de

Möglichkeiten des Einsatzes aktueller Methoden zur Proteinanalyse bei der Tierimpfstoffentwicklung. Gerald-F. Gerlach, Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover

Die zunehmenden Probleme mit dem Einsatz von Antibiotika zur Bekämpfung bakterieller Infektionskrankheiten bei landwirtschaftlichen Nutztieren haben der Verwendung von Impfstoffen als Alternative zur Pro- und Metaphylaxe wieder zu erhöhter Bedeutung verholfen. Eine wirksame Impfung vermeidet klinische Symptome, kann aber anders als eine antibiotische Behandlung die Besiedlung mit dem virulenten Erreger in der Regel nicht verhindern. Da durch die Änderung des Haftungsrechts beim Tierkauf zunehmend Pathogenfreiheit garantiert werden muss, stellt es ein Problem dar, dass es bisher keine antibakteriellen Impfstoffe gibt, die anhand serologischer Untersuchungen eine sichere Unterscheidung von geimpften und gesunden sowie geimpften und infizierten Tieren erlauben (sogenannte Negativ-Markerimpfstoffe).

Am Beispiel des porcinen Lungeninfektionserregers *Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae* wird gezeigt, dass die Mehrzahl immunogener Proteine an der Oberfläche des Erregers lokalisiert ist und durch eine milde Detergenzbehandlung abgelöst werden kann. Durch Auftrennung dieser Proteine in der zweidimensionalen Gelelektrophorese können der isoelektrische Punkt und die Molekularmasse der verschiedenen Proteine bestimmt werden; die Analyse in einem sogenannten Q-Tof (Quadrupole - time of flight) Massenspektrometer erlaubt dann eine de-novo Sequenzierung direkt aus den auf dem Gel sichtbaren Proteinspots. Durch eine nachgeschaltete Datenbankanalyse ist dann die eindeutige Identifizierung des Proteins möglich. Damit sind dann die für ein Entfernen dieses Proteins aus dem Impfstoff erforderlichen Kenntnisse vorhanden, und somit kann grundsätzlich ein Negativ-Markerimpfstoff hergestellt werden.

Für einen Negativmarker-Lebendimpfstoff ist es zusätzlich erforderlich, eine definierte Attenuierung des Erregers zu erreichen. Wiederum am Beispiel von *A. pleuropneumoniae* wird gezeigt, dass es in der bronchoalveolaren Lavageflüssigkeit (BALF) von Schweinen mindestens ein Protein gibt, das eine Veränderung der Genexpression von *A. pleuropneumoniae* bewirkt. Dieses Protein wurde mithilfe einer Kombination von 2-D-Gelelektrophorese, Q-Tof Analyse und Datenbanksuche identifiziert. Die Aufklärung der verantwortlichen bakteriellen Regulationsmechanismen könnte die Möglichkeit zur Konstruktion „intelligent“ attenuierter Mutanten schaffen; diese wären nicht mehr in der Lage auf die Veränderungen im Wirt im Falle einer Infektion zu reagieren und würden somit im Gegensatz zum nicht attenuierten Pathogen in dem Moment eliminiert, in dem der Wirt entsprechende, mit dem Erreger interagierende, Proteine gebildet hat.

Was leisten 'Genomics' und 'Proteomics' bei der Identifizierung parasitenspezifischer Stoffwechselwege und neuer Zielstrukturen?

Klaus Lingelbach
Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

Genomics und Proteomics sind Technologien, die eine zunehmende Anwendung in unterschiedlichen Bereichen der Biowissenschaften finden. Ein Ziel des Vortrages besteht darin, aus der Sicht des Anwenders die Potentiale dieser Technologien aufzuzeigen.

Genomprojekte existieren für viele Parasiten und bilden eine wesentliche experimentelle Voraussetzung für Proteomanalysen mit dem langfristigen Ziel, Stoffwechselwege der Zelle aufzuklären, um neue Zielstrukturen für Medikamente oder Impfstoffe zu identifizieren. Neben den experimentellen Ansätzen, Proteome von Zellen oder subzellulären Kompartimenten zu erfassen, gewinnt die Bioinformatik als komplementärer Ansatz zunehmend an Bedeutung. Am Beispiel einiger Parasitosen wird erläutert, wie diese Technologien eingesetzt werden können, um Resistenz- und Pathogenitätsfaktoren molekular zu definieren.

Parasiten aus der Gruppe der *Apicomplexa* sind von großer human- und veterinärmedizinischer Bedeutung. Daher sind Genom- und Proteomprojekte bei diesen Erregern am weitesten fortgeschritten. Die Genomanalyse apikomplexer Parasiten führte zur Identifizierung eines zirkulären Genoms, das erhebliche Ähnlichkeiten zu dem Genom pflanzlicher Plastiden aufweist. Diese Erkenntnis bildete die Grundlage weiterführender Proteomanalysen, die die Aufklärung pflanzenspezifischer Stoffwechselwege in apikomplexen Parasiten ermöglichten. Die experimentellen und bioinformatischen Vorgehensweisen werden an diesem Beispiel veranschaulicht. Die Identifizierung pflanzlicher Synthesewege eröffnet neue therapeutische Möglichkeiten, da Inhibitoren eingesetzt werden können, von denen eine Beeinträchtigung des Wirtsorganismus nicht zu erwarten ist. Im Falle der Malaria sind solche Wirkungsstoffe bereits in der klinischen Testung.

PRAKTISCHER EINSATZ MOLEKULAR BIOLOGISCHER TECHNOLOGIEN IN DER IMPFSTOFFENTWICKLUNG IN DER VETERINÄRMEDIZIN

D. Lütticken

Intervet International bv, P.O. Box 31, 5830 AA Boxmeer, The Netherlands

Die Anforderungen an moderne Produkte für die Tiergesundheit werden aus der Sicht des Verbrauches, des Herstellers und der Zulassungsbehörden dargestellt.

An Hand der verfügbaren molekularbiologischen Technologien wird aufgezeigt welche Eigenschaften von Impfstoffen durch Einsatz der Molekularbiologie gezielt beeinflusst werden können.

Die gesetzlichen Rahmenbedingungen zur Zulassung von Produkten für die Veterinärmedizin in Europa und USA werden verglichen und Ergebnisse einer vor kurzem durchgeführten eigenen Recherche zur Patentierung von Impfstoffen unter Anwendung molekular biologischer Techniken werden präsentiert. Die Ergebnisse zeigen, dass Europa nur einen Anteil von 20-25% an Impfstoffinnovationen aufweisen kann.

Zwei Beispiele von Impfstoffen für Geflügel, die unter Verwendung molekularbiologischer Techniken zur Marktreife entwickelt worden werden vorgestellt, ein Markerimpfstoff gegen Newcastle Disease (1), bei dem verschiedene Verfahren angewendet wurden und, eine Subunitvakzine gegen die Infektiöse Bursitis (2) bei dem durch Verwendung eines geeigneten Expressionssystem die Nutzung von Organmaterial zur Antigengewinnung vermieden werden konnte.

Literatur:

- (1) Mebatsion, T., et al. *Journal of Virology* 76, p. 1038-1046 (2002).
- (2) Loon, A. van, et al. *Proceedings XI International Congress of WVPA*, 1997, p. 8.