

Neue Impfstoffe gegen Viruskrankheiten bei Tieren

Entwicklungssprung durch die Gentechnologie

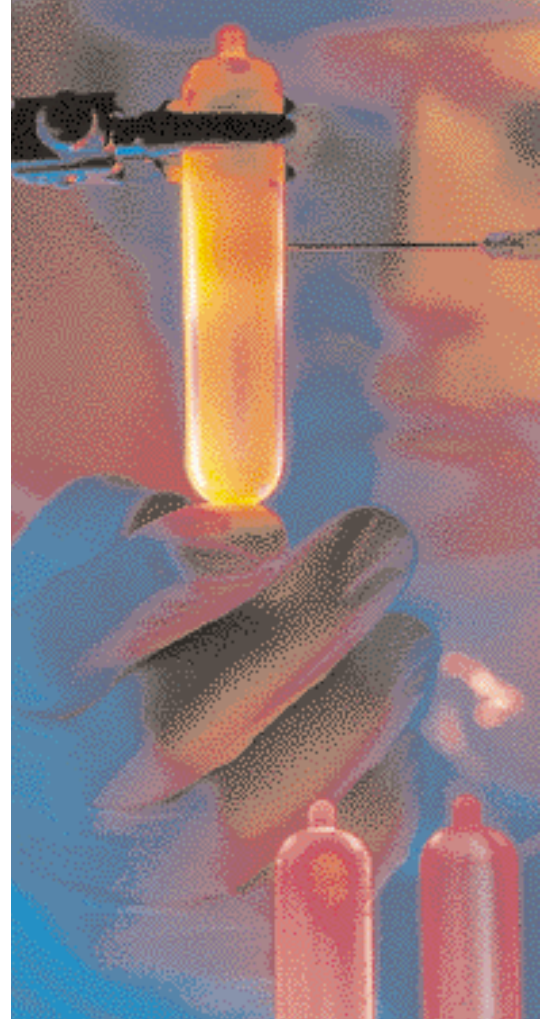
V. Kaden, G. M. Keil, N. Osterrieder, H. Schirrmeier und T. C. Mettenleiter (Insel Riems)

Gegen Infektionskrankheiten, die durch Viren verursacht werden, gibt es keine oder nur unzureichende Behandlungsmöglichkeiten. Daher ist die Entwicklung von Impfstoffen, die vorbeugend eingesetzt werden, eine der Hauptaufgaben virologischer Forschung. Die aktive Immunisierung von Tier und Mensch erfolgt entweder mit Impfstoffen aus vermehrungsfähigen Erregern (sog. „Lebendvakzinen“) oder inaktivierten Erregern („Totvakzinen“). Seit einigen Jahren werden sowohl Lebend- als auch Totvakzinen unter Einsatz gentechnologischer Verfahren hergestellt.

Die gezielte Inaktivierung von Genen, die für die krankmachenden Eigenschaften der Erreger verantwortlich sind, führt zu biologisch sicheren Lebendvakzinen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, Gene anderer

Erreger in das genetische Material eines Virus einzubauen und so gleichzeitig gegen mehrere Infektionen zu schützen („Vektorvakzinen“). Immunogene Proteine von viralen Erregern können auch biotechnologisch in Bakterien oder in Zellkulturen hergestellt und nach der Reinigung für eine Impfung verwendet werden („Subunit-Vakzinen“). Die neueste Entwicklung beruht auf der Immunisierung mit „nackter“ DNA (DNA-Vakzinen).

Gentechnologisch produzierte Vakzinen bieten gegenüber konventionell hergestellten Impfstoffen mehrere Vorteile. Durch die gezielte Manipulation ist eine hohe biologische Sicherheit von Lebendvakzinen gegeben. Zweitens kann ein hoher gleichbleibender Reinheitsgrad der Impfstoffe gewährleistet werden. Drittens erlaubt die Gentechnologie die Schaffung sogenannter „Markerimpf-



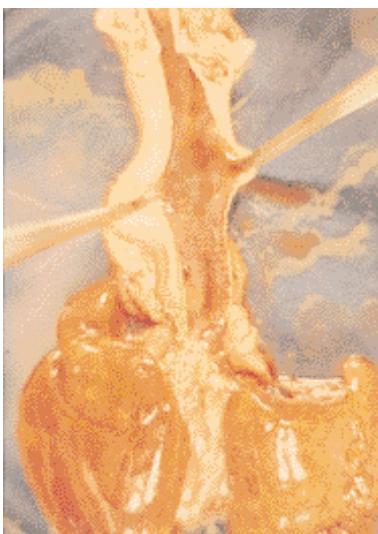
stoffe“ und damit die Möglichkeit, zwischen geimpften und infizierten Tieren zu unterscheiden.

Im folgenden wird anhand von Beispielen auf die Möglichkeiten der Bekämpfung von viralen Infektionskrankheiten bei Tieren durch gentechnologisch produzierte Impfstoffe eingegangen.

HÄMORRHAGISCHE KANINCHENKRANKHEIT

Im Jahr 1984 trat in China bei Angorakaninchen, die zwei Monate zuvor aus Deutschland importiert worden waren, eine hochansteckende Viruserkrankung auf, an der nahezu alle betroffenen Tiere in kurzer Zeit verendeten. Die Kaninchen hatten massive Leberschäden und Blutungen (= Hämorrhagien) in verschiedenen Organen (Abb.1). Dieses Krankheitsbild führte zu dem Namen 'Hämorrhagische Kaninchenkrankheit' (engl. Rabbit Hemorrhagic Disease, RHD). Die Seuche breitete sich in der Folgezeit sehr rasch aus und wurde ein Jahr später auch in Korea festgestellt.

Abb. 1: Blutungen in verschiedenen Organen, hier in der Lunge und der Luftröhre, sind typische Symptome der Hämorrhagischen Kaninchenkrankheit.





7.500 Nukleotide (Einzelbausteine der RNA) umfaßt. Die Viruspartikel bestehen im wesentlichen aus einem einzigen Protein, dem VP60. Dieses Protein löst im Tier die Bildung von virusneutralisierenden, das heißt vor einer Erkrankung schützenden Antikörpern aus. Alle Anstrengungen zur Entwicklung eines Impfstoffes zielen also letztlich darauf ab, im geimpften Tier Antikörper gegen dieses Protein zu erzeugen.

Bis heute läßt sich der Erreger nicht in Zellkultur züchten, so daß alle eingesetzten Impfstoffe gegen die Kaninchenseuche aus der Leber experimentell infizierter Tiere gewonnen werden müssen. Dies ist nicht nur sehr aufwendig, sondern auch aus Gründen des Tierschutzes längerfristig nicht tolerierbar. Unsere Arbeiten haben daher das Ziel, auf gentechnischem Wege einen Impfstoff zu entwickeln, der Kaninchen einen wirksamen Schutz verleiht.

Dazu wurde die genetische Information für das VP60 in ein anderes Virus verbracht, das Kaninchen nicht befallen kann. Solche Erreger sind zum Beispiel Insektenviren wie die

Baculoviren. Dieser Virentyp kann sich in Warmblütern nicht vermehren und erfüllt so bereits wesentliche Forderungen an die Biosicherheit. Typisch für diese Viren ist, daß im Überschuß ein Protein (Polyhedrin) gebildet wird, in das die reifen Viruspartikel eingeschlossen werden, wodurch sie mit einer besseren Überlebensfähigkeit in der freien Natur ausgestattet sind. Diese Überschußproduktion macht man sich zunutze, indem man DNA-Abschnitte, die für das Polyhedrin kodieren, gegen die des gewünschten Proteins austauscht. Auf diese Weise wird anstelle des Polyhedrins zum Beispiel VP60 produziert.

Zu diesem Zweck haben wir den für das VP60 kodierenden Genabschnitt in Baculoviren eingefügt. Diese Viren produzieren nun im Rahmen



In Fermenten können neuartige Impfstoffe mit Hilfe von Bakterien hergestellt werden

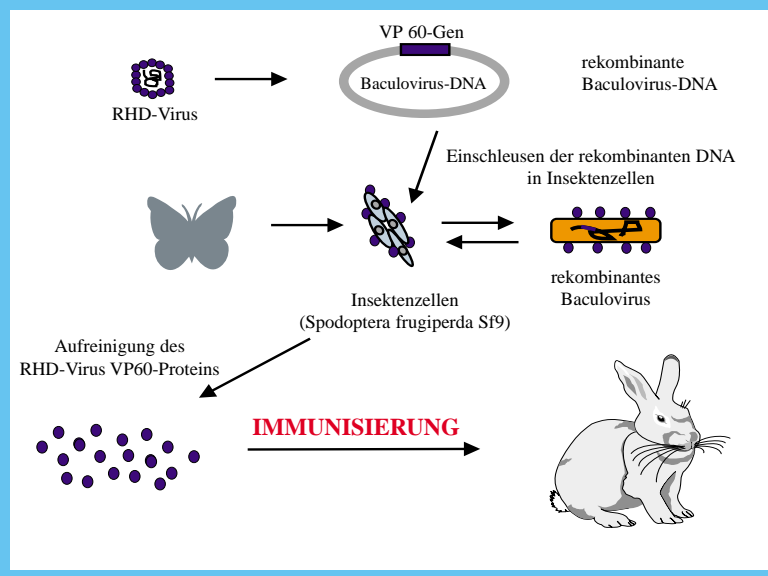
Beginnend mit dem Jahr 1986 wurde bis 1990 nahezu der gesamte europäische Kontinent erfaßt. Seuchenausbrüche wurden auch aus Mexiko, Nordafrika und dem Nahen Osten gemeldet. Der größte Seuchenherd existiert gegenwärtig in Australien, wo der Erreger im Rahmen eines wissenschaftlich und ethisch umstrittenen Programms zur Bekämpfung der Wildkaninchenplage freigesetzt wurde.

In Deutschland wurden erste RHD-Fälle im 2. Halbjahr 1988 festgestellt. Trotz des Einsatzes von Impfstoffen sind seit 1989 jährlich zwischen 1000 und 2000 Seuchenausbrüche zu verzeichnen.

Die RHD ist ein Beispiel dafür, daß ständig mit dem plötzlichen Auftreten neuer Erkrankungen gerechnet werden muß. In diesen Fällen ist es von besonderer Wichtigkeit, sehr schnell alle notwendigen Werkzeuge für Diagnose und Bekämpfung verfügbar zu machen.

Der Erreger der Hämorrhagischen Kaninchenkrankheit wird den Caliciviren zugeordnet. Die gesamte genetische Information ist in einem einzigen RNA-Strang lokalisiert, der circa

Abb. 2: Prinzip der Herstellung von Subunit-Vakzinen mit Hilfe von Baculoviren. Die genetische Information für ein schutzerzeugendes Protein wird in das Erbgut der Baculoviren integriert und das Fremdgen nach Infektion von Insektenzellen exprimiert. Nach Aufreinigung wird das Protein zur Immunisierung verwandt.



ihres eigenen Vermehrungszyklus in kultivierten Insektenzellen das VP60 in großer Menge (Abb. 2 und 3). Dieses Material wurde dann zur Impfung von Kaninchen verwendet. Nach einmaliger Impfung bildeten die Tiere Antikörper, die sie vor einer ansonsten tödlich verlaufenden RHD-Virus-Infektion schützen. Der Schutz trat innerhalb von 6-10 Tagen ein und war mit dem durch herkömmliche Impfstoffe vermittelten vergleichbar (Abb. 4).

Auf diesem Wege ist es gelungen, eine neuartige Vakzine zu entwickeln, die in Zukunft die Verwendung von Tieren zur Herstellung von Impfstoffen gegen RHD überflüssig machen sollte.

SCHWEINEPEST

Die Klassische oder Europäische Schweinepest (KSP) verursacht hohe wirtschaftliche Verluste in der Landwirtschaft. Durch verschiedene Bekämpfungsmaßnahmen konnte die KSP-Verseuchung beim Hausschwein im europäischen Raum zurückgedrängt werden, wobei lange Zeit ein

höchst wirksamer Lebendimpfstoff eingesetzt wurde. Mit der Internationalisierung des Marktes war es notwendig, die Schweinepestimpfung einzustellen, damit lebende Schweine und Fleischprodukte in und aus der Europäischen Union uneingeschränkt gehandelt werden können (Hintergrund: Um eine Verbreitung der Krankheit zu verhindern, dürfen nur KSP-negative Schweine gehandelt werden, was durch das Fehlen von Antikörpern gegen KSP definiert ist. Geimpfte Tiere bilden aber ebenso wie latent infizierte Schweine Antikörper, so daß eine Unterscheidung nicht möglich ist).

Die Bekämpfung der Schweinepest erfolgt daher zur Zeit durch Tötung infizierter und ansteckungsverdächtiger Tierbestände einschließlich Quarantäne- und Hygienemaßnahmen sowie intensiver diagnostisch-epidemiologischer Untersuchungen. Die auf der Richtlinie 80/217/EWG basierende Schweinepest-Verordnung vom 24.10.1994 erlaubt jedoch unter besonderen Seuchenbedingungen die Impfung. Impfungen mit einem konventionellen und daher unmar-

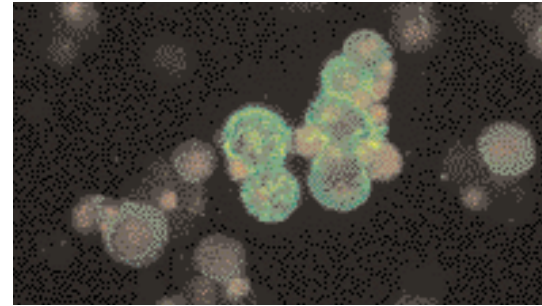


Abb. 3: Expression von VP60 des RHD-Virus in Insekten-Zellkulturen, die mit gentechnisch veränderten Baculoviren infiziert worden sind. Nachweis des Proteins mittels eines VP60-spezifischen Antikörpers in der Immunfluoreszenz.

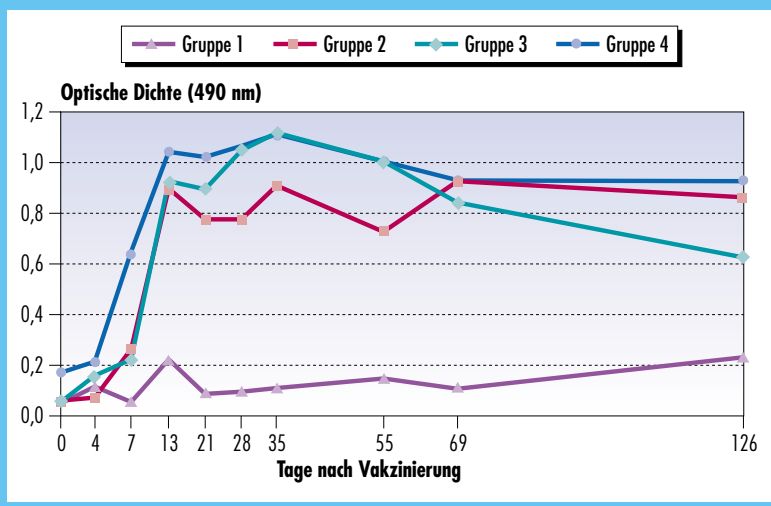
ktierten Impfstoff führen allerdings zu umfangreichen Handelsrestriktionen, die ebenfalls große wirtschaftliche Verluste nach sich ziehen.

Schweinepestausbüchre haben in Deutschland, Belgien und den Niederlanden enorme wirtschaftliche Schäden verursacht. So kam es 1997 allein in Deutschland zu 44 Ausbüchren, bei denen 39.000 Schweine gekeult werden mußten; darüber hinaus wurden in 351 Kontaktbetrieben 36.700 Tiere vorbeugend gekeult. Um hier Abhilfe zu schaffen wird intensiv an der Entwicklung eines Markerimpfstoffes gegen die Schweinepest gearbeitet. An einen solchen markierten Impfstoff sind hinsichtlich seiner Unschädlichkeit und Wirksamkeit hohe Anforderungen zu stellen, wie

1. Schutz gegenüber einer natürlichen Kontaktinfektion;
2. keine Übertragung von Feldvirus durch geimpfte Schweine auf Kontakttiere;
3. keine Übertragung des Schweinepestvirus von geimpften Sauen auf die Nachkommen;
4. effektiver Langzeitschutz möglichst nach einmaliger Impfung;
5. eindeutige Unterscheidung von infizierten und geimpften Tieren;
6. keine Handelsbarrieren für die geimpften Schweine.

Bei der Entwicklung von Schweinepest-Markervakzinen wurden mehrere Wege beschritten. Schweine bil-

Abb. 4: Antikörperentwicklung nach Verabreichung eines kommerziellen Impfstoffes (Gruppe 2), von VP60 exprimierendem Baculovirus (Gruppe 3) und von mit Immunstimulantien versetztem Baculovirus (Gruppe 4) an Kaninchen. Gruppe 1: nicht vakzinierter Kontrolltiere. Die Antikörper wurden in einem ELISA gegen gereinigtes RHD-Virus getestet. Die Menge der gebildeten Antikörper (ablesbar an der Höhe der optischen Dichte) korreliert mit dem Impfschutz.

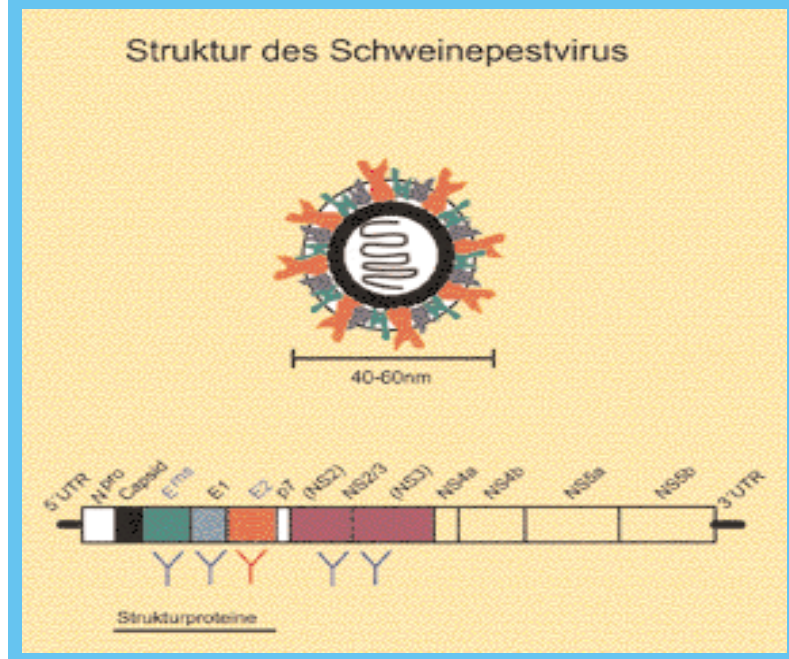


den nach natürlicher Infektion Antikörper gegen verschiedene Virusproteine, vor allem gegen die Strukturproteine E^{ns} und E2 sowie das Protein NS3 (Abb. 5). Besonders die gegen E2 gerichteten Antikörper führen zu einem Immunschutz, so daß dieses Protein in einem Impfstoff enthalten sein muß. Bisher wurde vor allem an der Entwicklung von Subunit-Vakzinen sowie rekombinanten Vektorvakzinen mit Erfolg gearbeitet. Während der Schweinepest-Markimpfstoff der ersten Generation, die Subunit-Vakzine, vor der Zulassung steht, dürften zur Einführung rekombinanter vermehrungsfähiger Vektorvakzinen noch umfangreiche Untersuchungen erforderlich sein.

Subunit-Vakzine

Bei der Subunit-Vakzine wird das Gen für das E2-Protein in das Genom eines genetisch veränderten Baculovirus integriert (Abb. 5; in Zusammenarbeit mit der Universität Gießen). Gereinigtes E2 dient dann als Totimpfstoff, wobei Antikörper nur gegen dieses Virusprotein gebildet werden. Werden zusätzlich Antikörper gegen weitere Proteine des Schweinepest-Virus gefunden, so liegt eine Infektion mit Feldvirus vor. Das Tier muß dann geschlachtet und unschädlich beseitigt werden. Eine solche Unterscheidung läßt sich durch Blutuntersuchungen durchführen. Laboruntersuchungen haben gezeigt, daß ein derartiger Impfstoff geeignet ist, nach zweimaliger Impfung eine Schweinepest-Infektion bei Läuferschweinen und Sauen sowie eine Feldvirusausscheidung wirksam zu verhindern. Da es sich bei der Subunit-Vakzine um einen Totimpfstoff handelt, der zudem nur auf einem einzelnen Protein – dem E2 – basiert, wird der Schutz im Vergleich zur konventionellen Lebendvakzine, bei der ja sämtliche Proteine des Schweinepestvirus vorliegen, später ausgebildet. Wichtige zellvermittelte Immunmechanismen werden ebenfalls nicht genügend in Gang gesetzt. Daher dürfte dieser Impfstoff, dessen

Abb. 5: Genom-Organisation des KSP-Virus. Das schutzvermittelnde E2-Glykoprotein wird mittels gentechnisch veränderter Baculoviren exprimiert und zur Immunisierung der Schweine verwandt. Nach Immunisierung mit E2 werden nur Antikörper gegen dieses Protein gebildet (rot dargestellte Antikörper). Die Immunantwort von infizierten Tieren ist gegen alle Proteine gerichtet, vor allem gegen E^{ns}, E2 und NS2/3 (blau dargestellte Antikörper). Wenn in Schweinen nur Antikörper gegen E2 nachzuweisen sind, handelt es sich um geimpfte Tiere, bei Nachweis von Antikörpern sowohl gegen E2 als auch gegen E^{ns} und/oder NS2/3 um infizierte Tiere.



Herstellung auch relativ teuer ist, nur bedingt für einen Einsatz geeignet sein. Dennoch stellt er ein wichtiges Instrument bei der künftigen Beherrschung der Schweinepest dar.

Rekombinante Vektorvakzinen

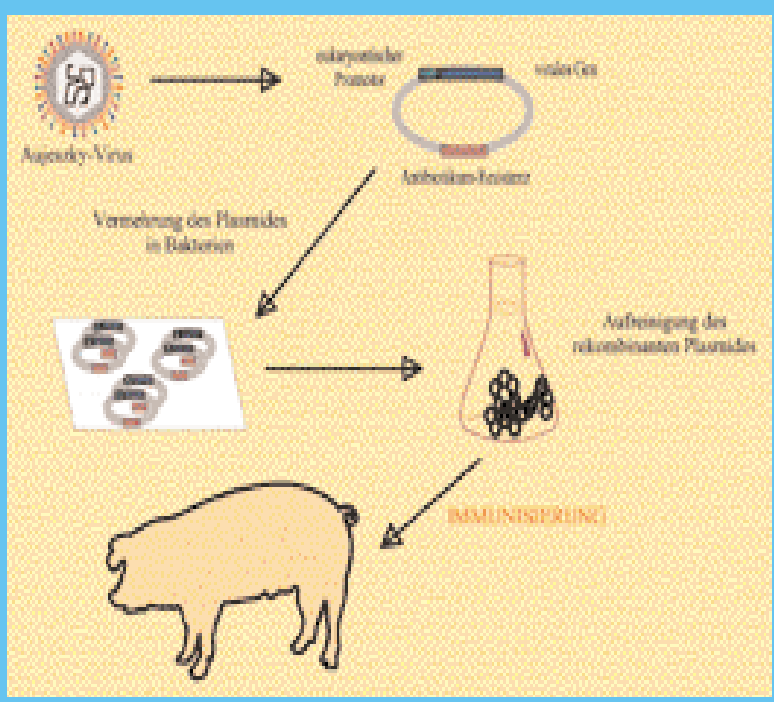
Arbeiten zur Entwicklung von Markervakzinen auf der Grundlage von vermehrungsfähigen Viren als Träger (Vektoren) KSP-Virus-spezifischer Antigene wurden bisher sowohl in Deutschland (BFAV, Universität Gießen) als auch im Ausland durchgeführt. Grundlagen hierfür bildeten genetisch veränderte Viren, wie beispielsweise das Virus der Aujesky'schen Krankheit, in dessen genetisches Material das Gen für E2 integriert wurde. Vakzinen auf der Basis vermehrungsfähiger Vektoren haben entscheidende Vorteile gegenüber

Subunit-Vakzinen: Neben der Antikörper-Immunität wird auch die zellvermittelte Immunität stimuliert, was zu einer höheren und früheren Schutzwirkung führt. Gerade letzteres ist zum Beispiel für Schweinebestände von Bedeutung, die unmittelbar Kontakt zum Seuchenbetrieb hatten. Ein weiterer Vorteil einer solchen Vakzine ergibt sich aus der Tatsache, daß nicht nur effizient gegen Schweinepest immunisiert werden kann, sondern auch gegen den Erreger, der als Vektor genutzt wird (z. B. Schweinepest und Aujesky'sche Krankheit).

ANIMALE HERPESVIREN ALS MARKER- UND VEKTORIMPFSTOFFE

Herpesviren sind bedeutende Krankheitserreger bei Mensch und

Abb. 6: Prinzip der DNA-Immunsierung: Das virale Gen, welches für ein schutz-erzeugendes Protein kodiert, wird in ein Plasmid unter Kontrolle starker Promotoren eingefügt und in Bakterien vermehrt. Die Plasmid-DNA wird nach Aufreinigung in Schweine injiziert. Nach der Impfung kommt es zu einer Immunreaktion im Tier gegen das entsprechende Protein.



Tier und verursachen erhebliche ökonomische Verluste in der Nutztierhaltung. Die zur Zeit verfügbaren Impfstoffe für Rinder, Schweine und Geflügel müssen meist mehrmals angewendet werden, um einen sicheren Schutz vor den jeweiligen Erkrankungen zu gewährleisten. Ein weiterer Nachteil klassischer Impfstoffe ist, daß diese im allgemeinen keine Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren erlauben. Deshalb sind auch hier Markerimpfstoffe wünschenswert, um Bekämpfungsprogramme effizient durchführen zu können. Weiterhin werden Herpesvirus-Vektoren entwickelt, die zur Immunisierung gegen mehrere Krankheitserreger verwendet werden können.

In den Labors der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFAV) ist bereits ein solcher Impfstoff auf der Basis eines Herpesvirus hergestellt worden, der Rinder gegen zwei verschiedene Viruskrankheiten gleichzeitig schützt. Darüber hinaus sollen die immunisierenden Eigenschaften der Impfstoffe so erhöht werden, daß nach einmaliger Anwendung bereits ausreichender Schutz vorhanden ist.

Derartige kostengünstige Impfstoffe könnten vor allem in Staaten der Dritten Welt die Durchführung von Impfprogrammen wesentlich erleichtern.

Die Genome von Herpesviren enthalten eine Vielzahl von Genen (zwischen 60 und 200), von denen fast die Hälfte für die Virusvermehrung nicht benötigt wird. Einige von diesen können durch andere Gene ersetzt werden, ohne daß die Virusvermehrung in der Zellkultur und die schutzvermittelnden Eigenschaften im Tier wesentlich beeinträchtigt werden – beides eine Voraussetzung für die Entwicklung effizienter Vektorimpfstoffe der nächsten Generation.

DNA-VAKZINIERUNG GEGEN DIE AUJESZKY'SCHE KRANKHEIT

Bei konventionellen Lebend- und Totvakzinen wird mit Protein (=Antigen) geimpft. Es ist allerdings auch möglich, durch direkte Verabreichung eines Gens, das für ein immunogenes Protein kodiert, einen Impfschutz zu erzeugen. Hierbei entfällt

die zum Teil aufwendige Reinigung des Antigens. Darüber hinaus werden durch die DNA-Immunsierung beide Seiten des Immunsystems, die Antikörper- und die zellvermittelte Immunität, gleichermaßen stimuliert.

Für die DNA-Immunsierung wird das virale Gen in ein Plasmid (ringförmiges Stück Bakterien-DNA) eingefügt und unter die Kontrolle eines starken Promotors gebracht, also eines genetischen Elements, das später für eine hohe Synthese des Proteins in den Säugetierzellen sorgt. Das Plasmid wird in Bakterienkultur vermehrt. Wir haben diese Möglichkeit bei der Immunisierung gegen die Aujeszky'sche Krankheit der Schweine untersucht. Das Prinzip ist in Abbildung 6 dargestellt. Wurde den Versuchstieren die entsprechende Plasmid-DNA in die Haut injiziert, konnte ein belastbarer Impfschutz gegen eine Infektion mit dem Aujeszky-Virus hervorgerufen werden. Die Wirksamkeit lag zwischen der einer Tot- und einer Lebendvakzine.

NEUE CHANCEN

Die dargestellten Beispiele zeigen, wie mit gentechnischen Methoden effektive und sichere Impfstoffe entwickelt werden können. Den Nutzen haben nicht nur Landwirte, auch unter dem Blickwinkel des Tiereschutzes ergeben sich Vorteile: Spektakuläre Tötungsaktionen wie im Falle der Schweinepest wären vermeidbar, darüber hinaus eröffnen sich Möglichkeiten, Impfstoffe (z. B. gegen die Hämorrhagische Kaninchenkrankheit) vermehrt in Zellkulturen zu produzieren, wodurch sich die Verwendung von Labortieren deutlich reduzieren läßt. ■

Dr. habil. Volker Kaden, Dr. Günter M. Keil, PD Dr. Nikolaus Osterrieder, Dr. Horst Schirrmeyer, Prof. Dr. Thomas C. Mettenleiter, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Friedrich-Loeffler-Institute, 17498 Insel Riems