

Fortschritte in der Impfstoffentwicklung gegen Tuberkulose

Zusammenfassung

Die effektive Kontrolle der Tuberkulose, die noch immer zu den weltweit bedeutendsten Infektionskrankheiten zählt, wird am ehesten durch eine Kombination aus Chemotherapie und Impfung erreicht. Mit BCG steht zwar ein Impfstoff zur Verfügung, der jedoch den Ausbruch der Lungentuberkulose bei Erwachsenen als häufigste Erkrankungsform nicht verhindern kann. Die Entwicklung eines neuen Impfstoffs gegen Tuberkulose ist daher vorrangiges Ziel. Da die Infektabwehr von unterschiedlichen T-Zellpopulationen getragen wird, muß angestrebt werden, die für den Schutz optimale Kombination zu stimulieren. Ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit dem Erreger bereits infiziert, so daß möglicherweise zwei Impfstoffe benötigt werden: einer zur Bekämpfung der bereits etablierten Infektion (Infektionstherapie) und ein anderer zur raschen Erregerabwehr nach Erstkontakt (Infektionsprävention). Derzeit werden unterschiedliche Impfstoffkandidaten entwickelt, deren Erfolgchancen noch schwer abzuschätzen sind.

Schlüsselwörter

Tuberkulose · Impfung · BCG

Bis in unsere heutige Zeit ist die „alte“ Infektionskrankheit Tuberkulose (TB) noch eine der häufigsten Todesursachen, die 1998 ca. zwei Millionen Opfer forderte [1]. Die kontinentale Verteilung der weltweit registrierten TB-Fälle sah 1996 folgendermaßen aus: Europa 8%, Südostasien 34% und Afrika 18%. Die Entwicklungsländer tragen somit die Hauptlast der TB-Pandemie [1]. Aus epidemiologischer Sicht kommt erschwerend hinzu, daß Länder mit hoher HIV-Inzidenz am meisten von TB-Neuerkrankungen betroffen sind. Das Risiko, an TB zu erkranken, ist bei HIV-Infizierten 80mal und bei AIDS-Erkrankten 170mal höher als bei nicht HIV-Infizierten. Die Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* führt beim Menschen zu einem der folgenden Erscheinungsbilder:

- ▶ akute Erkrankung direkt nach Infektion (Primär-TB)
- ▶ aktive Krankheit viele Jahre nach erfolgter Infektion (Reaktivierungs-TB) oder
- ▶ Etablierung einer chronisch latenten Infektion ohne Krankheitsausbruch.

Ein Drittel der Weltbevölkerung (1,7 Milliarden Menschen) ist latent mit *M. tuberculosis* infiziert, von denen weniger als 5% während ihres Lebens eine aktive TB entwickeln. Selbst in Deutschland sind ca. 15.000 Menschen an TB erkrankt.

Es besteht Übereinstimmung darüber, daß TB durch chemotherapeutische Intervention nicht von der Erde verschwinden wird, obwohl die Chemotherapie eine effektive Maßnahme zur Behandlung des TB-Patienten darstellt. Neuere epidemiologische Erhebungen der WHO zeigen jedoch, daß das Arsenal der Tuberkulotika im Kampf gegen die TB zunehmend enger wird. In vielen Ländern steigen die TB-Fälle, die durch multiresistente (MDR, „multiple drug resistant“) *M. tuberculosis*-Stämme verursacht werden, dramatisch an [1, 2]. Epidemiologische Studien der WHO zur Resistenzentwicklung belegen, daß MDR-TB in allen fünf Kontinenten vorkommen, wobei in einem Drittel der Länder über 2% der Neuerkrankungen auf MDR-Stämme zurückzuführen sind. Besonders dramatisch ist die Situation in Lettland mit 30%, Indien mit 13% und Dominikanische Republik mit 10% MDR-TB-Fällen [1]. Diese besorgniserregenden Daten erfordern, die Vakzineforschung gegen TB massiv voranzutreiben, da die Entwicklung neuer antimykobakteriell wirksamer Substanzen wohl kaum mit der Resistenzentwicklung von *M. tuberculosis* Schritt halten kann.

Dr. Jürgen Hess
Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie,
Abteilung für Immunologie, Monbijoustraße 2,
D-10117 Berlin

J. Hess · St. H. E. Kaufmann

Progress in vaccine development against tuberculosis

Summary

Tuberculosis is, on a global level, still one of the most important infectious diseases. Effective control of tuberculosis could probably be achieved by a combination of chemotherapy and vaccination. Although a vaccine (BCG) is available, it cannot prevent the development of tuberculosis of the lungs in adults as the most frequent disease manifestation. The development of a new vaccine against tuberculosis therefore remains a primary goal. Because the immune defense against *M. tuberculosis* depends on different T-cell subpopulations, the optimal combination has to be stimulated to achieve protection. Because one third of the world population is already infected with *M. tuberculosis*, possibly two vaccines are needed: one therapeutic vaccine to fight an already established infection and a preventive vaccine. Currently different vaccine candidates are under development. It is still too early to predict, which may be successful.

Key words

Tuberculosis • Vaccine • BCG

Immunologische Voraussetzungen zur Entwicklung einer effektiven TB-Vakzine

M. tuberculosis gehört zur Gruppe der intrazellulären Bakterien, die sich innerhalb phagosomaler Vakuolen in ruhenden Makrophagen vermehren. Der Erreger hemmt die Phagosomenreifung und lebt daher in einem Kompartiment, das durch die geringe Anzahl lysosomaler Marker, u.a. Kathepsin D und Lysosomen-assoziiertes Membranprotein (LAMP-1), und durch einen relativ neutralen pH-Wert gekennzeichnet ist [3]. Die eigentliche Funktion dieser normalerweise angesäuerten Phagolysosomen liegt in der Abtötung eingedrungener Mikroorganismen, die mit der anschließenden Aufarbeitung antigener Strukturen verbunden ist. *M. tuberculosis* hat durch die Arretierung der Phagosomenreifung eine wirksame Verteidigungsstrategie entwickelt, die nicht nur ein intrazelluläres Überleben ermöglicht, sondern gleichzeitig auch die Präsentation eigener Antigene zur immunologischen Erkennung beeinträchtigt [4]. Aufgrund von Reifungsdefekten zeigen *M. tuberculosis*-infizierte Makrophagen eine geringe Oberflächenexpression von Haupthistokompatibilitäts-Komplex („major histocompatibility complex“,

MHC) Klasse-II-Molekülen und werden daher schlecht von antigenspezifischen CD4 T-Zellen erkannt [5, 6].

„Eine zentrale Rolle bei der immunologischen Kontrolle der TB spielen CD4 T-Lymphozyten von Th1-Typ, die als Leitzytokin IFN- γ produzieren.“

Die zentrale Rolle der CD4-T-Zelle bei der Kontrolle der TB steht aber außer Frage. Die protektiven CD4 T-Lymphozyten sind vom Th1-Typ, d.h. sie produzieren inflammatorische Botenstoffe mit Interferon- γ (IFN- γ) als Leitzytokin und begünstigen somit eine zelluläre Immunantwort [7]. Die wichtigste Funktion von IFN- γ stellt dabei die Aktivierung antimykobakterieller Funktionen in Makrophagen dar.

In den letzten zehn Jahren wurde durch eine Vielzahl von Forschungsarbeiten deutlich, daß CD4 T-Zellen nicht die einzigen Lymphozyten des Immunsystems sind, die zur TB-Kontrolle beitragen. Studien in experimentellen Tiermodellen und beim Menschen zeigen neben der Aktivierung von CD4 (Th1-Helferzellen oder zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL)) [8, 9], auch die Stimulierung von CD8 T-Zellen [10]. Normalerweise werden Antigene, die CD8 T-Zel-

Tabelle 1

Am Schutz gegen TB beteiligte T-Zellpopulationen

T-Zellpopulation	Antigen/Präsentations-Molekül	Kommentar
Konventionelle T-Zellen		
CD4T-Zellen	Peptid/MHC II	Wichtige Rolle unbestritten, Erkennung von Antigenen aus Phagosom
CD8 T-Zellen	Peptid/MHC I	Wichtige Rolle wahrscheinlich, Erkennung von Antigenen aus dem Zytoplasma
Unkonventionelle T-Zellen		
$\gamma\delta$ T-Zellen	Freier Phospholigand	Beteiligung möglich, Erkennung von Antigenen ohne bekannte Präsentationsstruktur
CD1 restringierte T-Zellen	Glykolipid/CD1	Beteiligung möglich, Erkennung von Antigenen aus Phagosom oder Zytoplasma

len zur Erkennung angeboten werden, im Zytoplasma der antigenpräsentierenden Zelle (APZ) über den zytoplasmatischen MHC-Klasse-I-Weg prozessiert [11]. Mittlerweile ist aber bekannt, daß Antigene endosomal lokalisierter Mikroorganismen über „alternative“ MHC-Klasse-I-Präsentationswege prozessiert werden, und so CD8 T-Zellen aktivieren können [12]. Dies dürfte auch für *M. tuberculosis* zutreffen. Neben konventionellen T-Zellen, die antigene Peptide im Kontext von MHC Molekülen erkennen [8, 9, 13, 14], könnten auch „unkonventionelle“ T-Zellen am Schutz gegen TB beteiligt sein (Tabelle 1). Hierzu zählen:

- ▶ eine T-Zellpopulation, die Glykolipide über CD1-Moleküle erkennt [15] und
- ▶ $\gamma\delta$ T-Zellen, die phosphorylierte Liganden erkennen [16].

CD1-Moleküle ähneln zwar in einigen Aspekten den MHC-I-Polypeptiden, sie werden aber von Genen außerhalb der MHC-Region kodiert und sind nicht polymorph. CD1-Moleküle binden mykobakterielle Glykolipide, welche dann von T-Lymphozyten erkannt werden [17]. Die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten erkennen unabhängig von bekannten Präsentationsstrukturen niedermolekulare mykobakterielle Liganden, die alle Phosphat enthalten und nicht zur Proteinklasse gehören [16]. Die konventionellen CD8 T-Zellen, die CD1-restringierten T-Zellen und die $\gamma\delta$ T-Zellen produzieren IFN- γ und sind zytotoxisch. Die Toxizität ist nicht auf infizierte Wirtszellen beschränkt, sondern zerstört auch Mykobakterien direkt [18].

Das Versagen der BCG-Vakzine und mögliche Implikationen für die weitere Impfstoffentwicklung

Der TB-Impfstoff BCG wurde bereits 1908 durch Attenuierung von *Mycobacterium bovis*, dem Erreger der Rinder-TB, etabliert [19]. Seit 1948 wurden mehr als drei Milliarden Menschen mit BCG geimpft. Obwohl BCG auch heute noch die am weitesten verbreitete Vakzine ist, wird ihr Wert kontrovers diskutiert. Genereller Konsens besteht zur schützen-

den Wirkung von BCG gegen ernste Formen einer systemisch verlaufenden *M. tuberculosis*-Infektion bei Kleinkindern, besonders gegen tuberkulöse Meningitiden [20].

Bei Erwachsenen ruft BCG jedoch lediglich geringen oder gar keinen Impfschutz gegen die am häufigsten vorkommende Reaktivierungs-TB hervor [20]. In unterschiedlichen kontrollierten Feldstudien lag die protektive Wirkung von BCG zwischen vollständig unwirksam und 80% Schutz [21]. Verschiedene Gründe können hierfür verantwortlich gemacht werden:

- ▶ genetische Variabilität und unterschiedliches Alter der Impflinge
- ▶ immunologische Kreuzreaktivität zwischen BCG und unterschiedlichen Umweltmykobakterien in verschiedenen Ländern der Welt
- ▶ Vorliegen einer latenten *M. tuberculosis*-Infektion
- ▶ fehlende Vergleichsmöglichkeiten zwischen den Vakzinierungsstudien aufgrund unterschiedlicher BCG-Stämme.

Genetische Unterschiede zwischen BCG und *M. tuberculosis* bieten mehrere Erklärungsmöglichkeiten für die unbefriedigende Effizienz von BCG. Am plausibelsten erscheint die Annahme, daß BCG durch die Attenuierung immunogene Antigene verloren hat, die für eine protektive Immunabwehr gegen TB essentiell sind. Der Nachweis deletierter Bereiche im BCG-Genom, die in allen klinischen *M. tuberculosis*-Isolaten und im Laborstamm H37Rv vorkommen, unterstützen diese Hypothese [22, 23]. In einer vergleichenden Genomanalyse zwischen *M. tuberculosis* H37Rv und zahlreichen BCG-Stämmen wurde kürzlich gezeigt, daß 129 ORF („open reading frames“) aus 16 Genombereichen bei fast allen BCG-Stämmen fehlen [23]. Neben diesen strukturellen Defiziten im BCG-Genom sind auch unterschiedliche Kontrollmechanismen der Genexpression während der Infektion und der intrazellulären Persistenz denkbar. Deutlich werden diese Defizite von BCG auf der Ebene der Genregulation durch den überproportionalen Anteil deletierter ORF, die für transkriptionelle Regulator-

ren bei *M. tuberculosis* H37Rv kodieren [23].

„Vom immunologischen Standpunkt aus betrachtet besteht eine Hauptschwäche von BCG in der ungenügenden Induktion von CD8 T-Zellen.“

Der Infektionsverlauf in CD8 T-zelldefizienten Mäusen zeigt, daß CD4 T-Zellen zur Kontrolle der BCG-Lebendvakzine ausreichen, während zur Kontrolle von *M. tuberculosis* CD4 und CD8 T-Zellen benötigt werden [24, 25]. Folglich werden durch BCG CD8 T-Zellen nicht in dem Maße induziert, wie sie zum Schutz gegen *M. tuberculosis* benötigt werden. Die Induktion einer balancierten Immunantwort aus protektiven CD4 und CD8 T-Lymphozyten kann vom BCG Impfstoff deshalb nicht geleistet werden. Dagegen ist wahrscheinlich, daß BCG $\gamma\delta$ - und CD1-kontrollierte T-Zellen in ausreichendem Maß stimuliert [25].

Die Suche nach protektiven Zielantigenen von *M. tuberculosis*

Die vollständig verfügbare Genomsequenz des Laborstamms *M. tuberculosis* H37Rv stellt einen wesentlichen Durchbruch bei der Entwicklung neuer TB-Impfstoffe dar [26]. Die vergleichende Genomanalyse von BCG und *M. tuberculosis* H37Rv erleichtert die Suche nach potentiell protektiven Antigenen [22, 23]. Basierend auf diesen Kenntnissen werden derzeit verschiedene Strategien zur Identifizierung von BCG- und *M. tuberculosis*-spezifischen Antigenen mit unterschiedlicher Genregulation verfolgt.

In der ersten Phase werden von *M. tuberculosis* differentiell exprimierte Proteine zum einen über subtraktive Analyse der Proteome von *M. tuberculosis* und BCG durch hochauflösende 2D-Gelelektrophorese gesucht und über anschließende Massenspektrometrie identifiziert [27]. Alternativ werden über einen molekulargenetischen Ansatz durch RT-PCR DNA-Amplifikation von in situ isolierter mykobakterieller RNA

(*M. tuberculosis* und BCG) differentiell exprimierte Gene von *M. tuberculosis* subtraktiv detektiert [28]. Zusätzlich werden Genprodukte von mutmaßlichen Virulenzfaktoren aus dem Genom von *M. tuberculosis* ausgewählt.

In der zweiten Phase dieser Strategie werden ausgewählte Antigene mittels DNA-Vakzinierung auf die Induktion einer Schutzwirkung im TB-Tiermodell getestet. Die Immunisierung mit eukaryontischen Expressionsplasmiden, die für mykobakterielle Proteine kodieren, kann als immunologisches „Screening“-Verfahren für protektive Antigene eingesetzt werden [29–33]. Zudem stellt die DNA-Vakzinierung die effizienteste Methode dar, um ein weitreichendes T-Zell-repertoire – bestehend aus CD4 und CD8 T-Lymphozyten – für eine protektive Immunantwort gegen TB zu induzieren [34]. DNA-Immunisierungen gegen TB wurden in der Maus bereits erfolgreich durchgeführt. Das nicht-sezernierte Hitzeschockprotein Hsp 65 von *M. tuberculosis*, das sezernierte Protein Ag85A und das membranassoziierte Lipoprotein PstS3 konnten einen gewissen Schutz induzieren [31–33]. Diese DNA-Vakzinen waren bislang aber nicht in der Lage, einen besseren Schutz als BCG hervorzurufen [29–33]. Anzumerken

bleibt, daß DNA-Immunisierung mit Genen für den Proteinanteil von Lipoder Glykoproteinen niemals eine Immunantwort hervorrufen kann, die der natürlichen Immunität gegen *M. tuberculosis* vergleichbar wäre. Posttranslationale Modifikationen von Antigenen können einen deutlich immunstimulatorischen Effekt auf die Immunabwehr haben. Ein erfolgversprechendes Konzept stellt die DNA-Vakzinierung mit einer kompletten eukaryontischen Expressionsbank zur Identifizierung protektiver Antigene dar. Am Beispiel der *Mycoplasma*-Infektion der Maus wurde diese Strategie („Vaccinomics“) bereits erfolgreich getestet [35].

In dieser Phase der Impfstoffentwicklung wird es notwendig, die Stimulation des menschlichen Immunsystems durch die ausgewählten Antigene zu analysieren. Unterschiedliche T-Zellstimulationen durch rekombinant hergestellte Antigene bei Tuberkulin-positiven, Tuberkulin-negativen gesunden Probanden bzw. TB-Patienten sollten zusätzlichen Aufschluß über die Immunogenität der Antigene in Populationen mit unterschiedlichen HLA-Phänotypen geben. In einer weiteren vorklinischen Phase wird die schützende Wirkung identifizierter *M. tuberculosis*-spezifi-

scher Antigene im Meerschweinchenmodell der pulmonalen TB getestet [29, 36]. Ein vielversprechendes Tiermodell, das die TB-Erkrankung beim Menschen wohl am besten widerspiegelt, stellt ein nicht-humanes Primaten-TB-Modell des philippinischen Cynomolgus-Affen *Macaca fascicularis* dar [37]. Es dürfte damit der letzte Kontrollpunkt für einen potentiellen Impfstoff vor Studien am Menschen darstellen. Aufgrund des hohen Aufwands sollten diese Studien von internationalen Organisationen, bevorzugt unter Federführung der WHO, koordiniert werden.

Impfstoffkandidaten

Impfstoffkandidaten gegen Tuberkulose können grob in zwei Gruppen aufgeteilt werden: Spaltvakzinen („subunit vaccine“) und Lebendvakzinen (Tabelle 2) [25]. Spaltvakzinen bestehen im Prinzip aus Antigen und Adjuvans. Da reine Antigene eine ungenügende Immunogenität besitzen, müssen sie gemeinsam mit einem Adjuvans verabreicht werden, welches die Aufgabe hat, die Immunantwort zu verstärken. Die Verwendung von definierten Antigenen in Kombination mit Adjuvans verringert die potentiellen Risiken von Nebenwirkungen, die bei

Tabelle 2
Strategien der Impfstoffentwicklung gegen Tuberkulose

Vakzine Kandidaten	Kommentar	Referenzen
Spaltvakzine		
Protein + Adjuvans	Primär CD4 T-Zellen	Horwitz et al. [36], Baldwin et al. [29]
Protein an Mikrosphären adsorbiert	Primär CD4 T-Zellen	Venkataprasad et al. [38]
DNA Vakzine	CD4 und CD8 T-Zellen	Kamath et al. [30], Tascon et al. [31], Huygen et al. [32], Tanghe et al. [33]
Lebende Vakzine		
<i>Homologe Vakzine</i>		
Attenuierte <i>M. tuberculosis</i> -Stämme	CD4 und CD8 T-Zellen	Pellicic et al. [40], Berthet et al. [41], Yuan et al. [42]
<i>Heterologe Vakzine</i>		
Auxtrophe BCG-Stämme	Primär CD4 T-Zellen	Guleria et al. [43]
Zytokine exprimierende BCG	Primär CD4 T-Zellen	Murray et al. [44]
Listeriolysin exprimierende BCG	CD4 und CD8 T-Zellen	Hess et al. [45]
Andere Träger	Vaccinaviren und <i>S. typhimurium</i> als Träger zur Aktivierung von CD4 und CD8 T-Zellen	Zhu et al. [46], Hess und Kaufmann [47]

Lebendvakzinen niemals völlig ausgeschlossen werden können. Inwieweit solche Spaltvakzinen aber ein langanhaltendes immunologisches Gedächtnis induzieren, hängt in erster Linie vom Adjuvans ab und muß in jedem Einzelfall geprüft werden. Gegebenenfalls müssen bei Spaltvakzinen mehrfache Injektionen (sog. „Booster“-Injektionen) in Kauf genommen werden, um protektive Immunität gegen den Krankheitserreger hervorzurufen.

Adjuvansformulierungen, wie z.B. biologisch-abbaubare Mikrosphären, wurden im experimentellen TB-Modell der Maus getestet. Ein 38 kDa-Lipoprotein von *M. tuberculosis* konnte hierbei eine T-zellvermittelte Immunantwort induzieren [38]. Im Meerschweinchen konnte das Protein Ag85A in Kombination mit MPL-Adjuvans (nicht-toxisches Lipid A-Derivat von *Salmonella minnesota*) einen gewissen Schutz gegenüber einer Aerosolinfection mit *M. tuberculosis* induzieren [29].

Im weiteren Sinne können zu den Spaltvakzinen auch die nackten DNA-Impfstoffe gezählt werden, obwohl hier statt des Proteins das kodierende Gen verabreicht wird. Die Immunogenität von nackten DNA-Impfstoffen kann durch geeignete Maßnahmen verstärkt werden [39]. Hierzu zählen die Integration von immunmodulatorischen Oligodeoxydinukleotiden mit sogenannten CpG-Motiven oder von Genen, die immunmodulatorische Faktoren, wie z.B. Zytokine kodieren. Auch die Expressionsform des Antigens kann durch entsprechende genetische Manipulation variiert werden. Während im Zytoplasma exprimierte Antigene primär über den MHC-Klasse-I-Weg prozessiert werden und dadurch bevorzugt CD8 T-Lymphozyten stimulieren, können sezernierte Antigene B-Lymphozyten und, nach Endozytose und Prozessierung über den MHC-Klasse-II-Weg, CD4 T-Zellen aktivieren.

Die Fähigkeit rekombinanter heterologer Lebendimpfstoffe bzw. homologer lebender Vakzine, eine potente zellvermittelte Immunantwort auszulösen, steht außer Frage. Wird jedoch ein Proteinantigen mit bisher unbekannter Vi-

renzfunktion für die Konstruktion eines rekombinanten Antigen-trägerstammes verwendet, könnte dieser neue Stamm im Wirtsorganismus eine Krankheit hervorrufen. Umgekehrt könnte die Inaktivierung von Genen, die für Impfantigene kodieren, die Immunogenität des attenuierten Vakzinstamms verringern. Mögliche Einflüsse von Antigenen auf den virulenten oder protektiven Charakter einer Lebendvakzine sollten bei der Impfstoffentwicklung gegen TB nicht unterschätzt werden.

„Die Konstruktion eines verbesserten Lebendimpfstoffes könnte durch die Entwicklung von gentechnologischen Methoden erleichtert werden, die eine gezielte oder zufällige Abschwächung mykobakterieller Virulenz erlauben.“

In den letzten Jahren wurde gentechnologische Methoden entwickelt, die eine homologe Rekombination und Transposon-Mutagenese bei *M. tuberculosis* erlauben und somit eine gezielte oder zufällige Abschwächung der mykobakteriellen Virulenz herbeiführen. *M. tuberculosis*-Mutanten mit definierten Gendefekten können entweder aufgrund (i) von Auxotrophien – z.B. durch *purC*-Gen-Inaktivierung – oder (ii) von Virulenzverlust – z.B. durch *erp*- oder *acr*- Deletion – im Wirtsorganismus nicht mehr überleben [40–42]. *Erp* stellt ein sezerniertes repetitives Protein von *M. tuberculosis* dar [41]. *Acr* dagegen ist ein zytoplasmatisches Protein, das in vitro vorwiegend in der stationären Wachstumsphase von *M. tuberculosis* produziert wird und in logarithmisch wachsenden Kulturen nicht detektierbar ist [42]. Es konnte gezeigt werden, daß die *acr*-Transkription in vitro unter gemäßigten, hypooxygenen Bedingungen in *M. tuberculosis*-infizierten Makrophagen am stärksten induziert wird. Die genaue biologische Funktion von *acr* und *erp* ist jedoch noch nicht bekannt. Auch sind derzeit zu diesen attenuierten *M. tuberculosis*-Impfstoffen noch keine Daten zur Protektion im Tiermodell verfügbar.

Der Allelaustausch mittels genetischer Rekombination und die Transposon-Mutagenese wurden auch zur weiteren Attenuierung von BCG verwendet. Auf diese Weise könnte die Anwendung dieser Vakzine bei immungeschwächten Individuen möglich werden [43]. SCID-Mäuse („severe combined immunodeficiency disease“) mit schwerwiegenden T- und B-Zelldefekten konnten die Infektion durch Methionin- oder Leucin-auxotrophe BCG-Stämmen über 33 Wochen kontrollieren. Im Gegensatz dazu verstarben SCID-Mäuse nach Infektion durch den konventionellen BCG-Stamm innerhalb von acht Wochen [43]. Gentechnologische Verfahren haben auch Möglichkeiten eröffnet, die Immunogenität des BCG-Impfstoffs zu verbessern. Durch die Expression von Interleukin-2 oder IFN- γ in rekombinanten BCG-Stämmen können die immunstimulatorischen Eigenschaften dieser Botenstoffe genutzt werden, um die Immunantwort gegen TB zu verstärken [44]. Weiterhin wurden rekombinante BCG-Stämme konstruiert, die ein biologisch aktives Listeriolysin sezernieren. Listeriolysin kann als porenbildendes Zytolysin die Verfügbarkeit von mykobakteriellen Antigenen für die MHC-Klasse-I-abhängige Präsentation verbessern und könnte damit das protektive Potential dieser BCG-Vakzine gegen TB erhöhen [45]. Auch zu diesen rekombinanten BCG-Stämmen liegen bisher noch keine Daten zum Schutz im Tiermodell vor.

Sollte ein einziges Antigen eine protektive Immunität gegen TB induzieren, so ist die Konstruktion von bakteriellen oder viralen Trägersystemen zur Expression von *M. tuberculosis*-spezifischen Proteinen denkbar. Attenuierte *Salmonella typhimurium*-Bakterien und Vacciniaviren als heterologe Antigen-träger für das Ag85B-Protein, ein 19 kDa sowie ein 38 kDa Lipoprotein von *M. tuberculosis* wurden bereits konstruiert [46, 47].

Antigene, die nicht zur Proteinklasse gehören

Wie im Abschnitt „Immunologische Voraussetzungen zur Entwicklung einer effektiven TB-Vakzine“ erwähnt, tragen CD1-kontrollierte T-Lymphozyten und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten wahrscheinlich zum optimalen Schutz gegen Tuberkulose bei. Die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten reagieren auf phosphorylierte Liganden, z.B. Alkylderivate und Oligonukleotide. Die CD1-kontrollierten T-Zellen erkennen unterschiedliche Glykolipide, unter denen Mykolsäuren und Lipoarabinomannane zu erwähnen sind. Diese Glykolipide stellen nämlich die wesentlichen Bausteine der wachsartigen Zellwand von Mykobakterien dar. Obwohl unwahrscheinlich ist, daß die unkonventionellen T-Lymphozyten die Hauptlast der Protektion gegen TB tragen, sollte ihre Beteiligung am Schutz berücksichtigt werden.

Während Lebendimpfstoffe auf der Basis von Mykobakterien – also genteletierte *M. tuberculosis*-Stämme oder rekombinante BCG-Stämme – diese Glykolipide bereits besitzen, fehlen sie Proteinspaltvakzinen einschließlich nackten DNA-Impfstoffen. Die Konstruktion von kombinierten Spaltvakzinen aus definierten Protein- und Glykolipidantigenen ist in diesem Fall in Erwägung zu ziehen. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß bei Impfversuchen, die in den 50er Jahren durchgeführt wurden, Spaltvakzinen aus Proteinen häufig schlechter abschnitten als solche, die reichlich Zellwandbestandteile (also Glykolipide) enthielten [48]. Mit der Erkenntnis, daß (a) T-Lymphozyten für den Schutz gegen TB verantwortlich sind und (b) konventionelle T-Lymphozyten lediglich Peptide erkennen, wurden diese Daten jedoch in Zweifel gezogen. Erst die Befunde aus jüngster Zeit, daß unkonventionelle T-Lymphozyten mit Spezifität für Glykolipide existieren, lassen die frühen Impfversuche in einem neuen Licht erscheinen.

Ausblick

Derzeit wäre es verfrüht, sich auf einen einzigen Impfstoffkandidaten gegen TB festzulegen. Es ist derzeit noch nicht einmal auszuschließen, daß letztendlich zwei unterschiedliche Impfstoffe benötigt werden. Ein Impfstoff für die zwei Drittel der Weltbevölkerung, die gegenüber *M. tuberculosis* naiv sind und einer für das Drittel, das bereits mit dem Keim infiziert ist. Im ersten Fall ist das Hauptziel, die Etablierung der Infektion zu verhindern, d.h., den Erreger so früh wie möglich nach Eintritt zu bekämpfen (Infektionsprävention). Sezernierte Proteine, die vom Erreger sofort nach Befall des Wirts in großen Mengen produziert werden, sind bevorzugte Antigenkandidaten für diesen Impfstofftyp. Die Erkennung dieser Antigene soll das präaktivierte Immunsystem möglichst umgehend dazu bringen, den Erreger zu eliminieren bevor er sich in Alveolarmakrophagen stabil einnistet. Ein Impfstoff für bereits Infizierte hat dagegen primär die Aufgabe, persistierende Stoffwechsel-reduzierte Keime, die sich in einer granulomatösen Läsion versteckt halten, zu eliminieren (Infektionstherapie). Hierzu muß das Immunsystem wahrscheinlich mit hoher Sensitivität somatische und sezernierte Proteine erkennen, die in kleinsten Mengen freigesetzt werden. Um den Erreger zu erreichen, muß das Immunsystem wahrscheinlich erst den umgebenden Zellverband auflösen. Bei der natürlichen Infektion entwickelt sich eine wirksame Immunantwort, welche die Keime effizient eindämmt.

„Ziel der TB-Impfstoffentwicklung ist die Herstellung von Impfstoffen, die besser als die natürliche Immunität sind und eine sterile Eradikation erzielen.“

Inwieweit es gelingen wird, Impfstoffe zu konstruieren, die besser als die natürliche Immunität sind und eine sterile Eradikation erzielen, ist eine schwierige, aber auch interessante Herausforderung an die Forschung. Hoffnung weckt in

diesem Zusammenhang eine kürzlich durchgeführte Untersuchung, in der eine deutliche Reduktion der Organbelastung mit *M. tuberculosis* nach therapeutischer Impfung mit einem nackten DNA-Impfstoff für das Hsp65-Antigen erzielt wurde [49].

Danksagung. Die finanzielle Unterstützung durch das BMBF-Verbundprojekt „Mykobakterielle Infektionen“ und die Weltgesundheitsbehörde wird dankbar gewürdigt.

Literatur

1. The world health report (1999) **Making a difference**. ISBN 92 4 1561947, ISSN 1020–3311
2. Grange JM (1996) **Epidemiological aspects of drug resistance**. In: Mycobacteria and human disease. Arnold, London, pp 124–125
3. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG (1994) **Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase**. Science 263: 678–681
4. Deretic V, Fratte RA (1999) **Mycobacterium tuberculosis phagosome**. Mol Microbiol 31: 1603–1609
5. Hmama Z, Gabathuler R, Jeffries WA, de Jong G, Reiner NE (1998) **Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with Mycobacterium tuberculosis is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers**. J Immunol 161: 4882–4893
6. Pancholi P, Mirza A, Bhardwaj N, Steinman RM (1993) **Sequestration from immune CD4 T cells of mycobacteria growing in human macrophages**. Science 260: 984–986
7. Kaufmann SHE (1993) **Tuberculosis: The role of the immune response**. The Immunologist 1: 109–114
8. Mutis T, Cornelisse YE, Ottenhoff TH (1993) **Mycobacteria induce CD4 T cells that are cytotoxic and display Th1-like cytokine secretion profile: heterogeneity in cytotoxic activity and cytokine secretion levels**. Eur J Immunol 23: 2189–2195
9. Kumararatne DS, Pithie AS, Drysdale P, Gaston JSH, Kiessling R (1990) **Specific lysis of mycobacterial antigen-bearing macrophages by class II MHC-restricted polyclonal T cell lines in healthy donors or patients with tuberculosis**. Clin Exp Immunol 80: 314–323
10. Turner J, Dockrell HM (1996) **Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live Mycobacterium bovis BCG activates cytolytic CD8 T cells in vitro**. Immunology 87: 339–342

11. Schaible UE, Collins H, Kaufmann SHE (1999) **Confrontation between intracellular bacteria and the immune system.** *Advances in Immunology* 71: 267
12. Canaday DH, Ziebold C, Noss EH, Chervenak KA, Harding CV, Boom WH (1999) **Activation of human CD8 α BT cells by Mycobacterium tuberculosis via an alternate class I MHC antigen-processing pathway.** *J Immunol* 162: 372–379
13. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, Malin AS, Pathan AA, Andersen P, Dockrell H, Pasvol G, Hill AV (1998) **Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8 T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 270–275
14. Lewinson DM, Alderson MR, Briden AL, Riddell SR, Reed SG, Grabstein KH (1998) **Characterization of human CD8 T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis-infected antigen-presenting cells.** *J Exp Med* 187: 1633–1640
15. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat J-P, Sette A, Brenner MB, Porcelli SA, Bloom BR., Modlin RL (1997) **Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection.** *Science* 276: 1684–1687
16. Kaufmann SHE (1996) **$\gamma\delta$ and other unconventional T lymphocytes: What do they see and what do they do?** *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2272–2279
17. Porcelli SA (1995) **The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules.** *Adv Immunol* 59: 1–98
18. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melian A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL (1998) **An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin.** *Science* 282: 121–125
19. Calmette A, Guerin C, Negre L, Boquet A (1927) **Sur la vaccination preventive des enfants nouveaunes contre la tuberculose par le BCG.** *Ann Inst Pasteur* 3: 201
20. Huebner RE (1996) **BCG vaccination in the control of tuberculosis.** In: Shinnick TM (ed) *Current Topics in Microbiology and Immunology: Tuberculosis.* Springer, Berlin, pp 263–279
21. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F (1994) **Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis.** *JAMA* 271: 698–702
22. Maharais GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK (1996) **Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M.bovis.** *J Bacteriol* 178: 1274–1282
23. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM (1999) **Comparative genomics of BCG vaccine by whole-genome DNA microarray.** *Science* 284: 1520–1523
24. Hess J, Kaufmann SHE (1993) **Vaccination strategies against intracellular microbes.** *FEMS Microbiol Immunol* 7: 95–103
25. Kaufmann SHE, Andersen P (1998) **Immunity to Mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine.** In: Liew FY, Cox FEG (eds) *Immunology of intracellular parasitism.* *Chem Immunol* 70: 21–59
26. Cole ST et al (1998) **Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence.** *Nature* 393: 537–544
27. Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf H-J, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, Halada P, Lamer S, Hagens K, Kaufmann SHE (1999) **The comparative proteome analysis of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogen.** *Mol Microbiol (im Druck)*
28. Handfield M, Levesque RC (1999) **Strategies for isolation of in vivo expressed genes from bacteria.** *FEMS Microbiol Rev* 23: 69–91
29. Baldwin SL, D'Souza C, Roberts AD, Kelly BP, Frank AA, Lui MA, Ulmer JB, Huygen K, McMurray D, Orme IM (1998) **Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis.** *Infect Immun* 66: 2951–2959
30. Kamath AT, Feng CG, MacDonald M, Briscoe H, Britton WJ (1999) **Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of Mycobacterium tuberculosis.** *Infect Immun* 67: 1702–1707
31. Tascon RE, Colston MJ, Ragno S et al (1996) **Vaccination against tuberculosis by DNA injection.** *Nat Med* 2: 888–892
32. Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL et al (1996) **Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccine.** *Nat Med* 2: 893–898
33. Tanghe A, Lefevre P, Denis P, D'Souza S, Braibant M, Lozes E, Singh M, Montgomery D, Content J, Huygen K (1999) **Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors.** *J Immunol* 162: 1113–1119
34. Denis O, Tanghe A, Palfiet K, Jurion F, van den Berg TP, Vanonckelen A, Ooms J, Saman E, Ulmer JB, Content J, Huygen K (1998) **Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial antigen 85 A stimulates a CD4 and CD8 T-cell epitopic repertoire broader than that stimulates by Mycobacterium tuberculosis H37Rv infection.** *Infect Immun* 66: 1527–1533
35. Barry MA, Lai WC, Johnston SA (1995) **Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization.** *Nature* 377: 632–635
36. Horwitz MA, Lee B-WE, Dillon BJ, Harth G (1995) **Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins against Mycobacterium tuberculosis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1530–1534
37. Walsh GP, Tan EV, dela Cruz EC, Abalos RM, Villahermosa LG, Young LJ, Cellona RV, Nazareno JB, Horwitz MA (1996) **The Philippine cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease.** *Nat Med* 2: 430–436
38. Venkataprasad N, Coombes AGA, Singh M, Rohde M, Wilkinson K, Hudecz F, Davis SS, Vordermeier HM (1999) **Induction of cellular immunity to a mycobacterial antigen adsorbed on lamellar particles of lactide polymers.** *Vaccine* 17: 1814–1819
39. Shiver JW, Ulmer, JB, Donnelly JJ, Liu MA (1996) **Naked DNA vaccination.** In: Kaufmann SHE (ed) *Concepts in vaccine development.* Walter de Gruyter, Berlin New York, pp 423–436
40. Pelicic V, Jackson M, Reyart J-M, Jacobs WR Jr, Gicquel B, Guilhot C (1997) **Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in Mycobacterium tuberculosis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10955–10960
41. Berthet F-X, Lagranderie M, Gounon P, Laurent-Winter C, Ensergueix D, Chavarot P, Thouron F, Maranghi E, Pelicic V, Portnoi D, Marchal G, Gicquel B (1998) **Attenuation of virulence by disruption of the Mycobacterium tuberculosis erp gene.** *Science* 282: 759–762
42. Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR, Barry CE 3rd (1998) **The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of Mycobacterium tuberculosis is required for growth in macrophages.** *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9578–9583
43. Guleria I, Teitelbaum R, McAdam RA, Kalpana G, Jacobs WR Jr, Bloom BR (1996) **Auxotrophic vaccines for tuberculosis.** *Nat Med* 2: 334–337
44. Murray PJ, Aldovini A, Young RA (1996) **Manipulation and potentiation of anti-mycobacterial immunity using recombinant BCG secreting cytokines.** *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 934–939
45. Hess J, Miko D, Catic A, Lehmsiek V, Russell DG, Kaufmann SHE (1998) **Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin strains secreting listeriolysin of Listeria monocytogenes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5299–5304
46. Zhu X, Venkataprasad N, Ivanyi J, Vordermeier HM (1997) **Vaccination with recombinant vaccinia viruses protects mice against Mycobacterium tuberculosis.** *Immunology* 92: 6–9
47. Hess J, Kaufmann SHE (1999) **Live antigen carriers as tools for improved anti-tuberculosis vaccines.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 23: 165–173
48. Crowle AJ (1988) **Immunization against tuberculosis: what kind of vaccine?** *Infect Immun* 56: 2769–2773
49. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD, Lima VMF et al (1999) **Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination.** *Nature (im Druck)*