

## VAAM-Promotionspreisträger 2003

## Untersuchungen zum Einsatz rekombinanter Hefen als neuartige Lebendvakzine

Frank Breinig

► In dieser Dissertation wurden grundlegende Fragestellungen zum Einsatz des eukaryotischen Einzellers „Hefe“ als neuartige Lebendvakzine untersucht und vier verschiedene Themenbereiche bearbeitet:

**a) Identifizierung geeigneter Hefen zum Einsatz als Antigen-„Carrier“:** Die zelluläre Immunantwort gegen 14 verschiedene Hefegattungen wurde durch intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung in antigenspezifisch aktivierten Gedächtnis-T-Lymphozyten direkt in menschlichem Vollblut untersucht. Dabei konnten gegen eine Reihe verschiedener Hefegattungen extensive MHC Klasse I-restringierte CD8-T-Zell-Antworten beobachtet werden, während die erhaltene Antwort der CD4-T-Zellen nur gering ausfiel. Die für die Immunreaktionen verantwortlichen Epitope sind in der Hefezellwand lokalisiert. Bei Hefe-spezifischen CD8-T-Lymphozyten handelt es sich um enddifferenzierte Effektor-T-Zellen, die überraschenderweise kein Perforin besaßen; die biologische Bedeutung dieser Beobachtung ist noch unklar. Da intakte Zellen der Hefen *S. cerevisiae* und *Sz. pombe* lediglich eine geringe Anzahl an Gedächtnis-T-Lymphozyten stimulierten, stellen Bäcker- und Spalthefe potenzielle Vakzinekandidaten dar<sup>[1]</sup>.

**b) Untersuchung eines rekombinant in *Sz. pombe* exprimierten viralen Proteins in Hinblick auf seine Fähigkeit, antigenspezifische Gedächtnis-T-Lymphozyten im Vollblut infi-**

**zierter Spender zu stimulieren:** Das rekombinante in *Sz. pombe* exprimierte Modellantigen pp65 von HCMV ist in der Lage, spezifische, zuvor gegen das natürliche Virusprotein gebildete, Gedächtnis-T-Zellen im Blut serumpositiver Individuen zu stimulieren. Im Vergleich zu einem Gesamt-Virus-Lysat zeigt es darüber hinaus bei einigen der untersuchten Spender eine ausgeprägtere Aktivierung von CD8 T-Lymphozyten; dies beruht wahrscheinlich auf einer verbesserten Einschleusung des rekombinanten Proteins in den MHC I-vermittelten Weg der Antigenpräsentierenden Zellen (APC) beziehungsweise auf adjuvantischen Eigenschaften von Hefeproteinen<sup>[2]</sup>.

**c) Die Etablierung eines Systems zur Zell-Oberflächen-Expression in Hefe:** Es wurde ein System zur Expression von Fremdproteinen auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* etabliert, welches auf der Konstruktion von Fusionsproteinen aus dem „Leader“-Peptid des Kre1-Proteins sowie den C-Termini von Cwp2p und Flo1p beruht. Mit Hilfe dieses Systems konnten sowohl das HA-Peptid als auch GFP *in vivo* auf der Oberfläche der Hefezellen kovalent verankert werden. FACS-Analysen zeigten, dass etwa 70 Prozent der Hefen das entsprechende Fusionsprotein exprimierten; die verschiedenen Trägerproteine unterschieden sich dabei nicht signifikant in ihrer Verankerungseffizienz. Die Insertion einer 350 Aminosäuren großen, Serin/Threoninreichen „Spacer“-Sequenz in die Fusionsproteine führte zu einer drastischen Verbesserung der Zugänglichkeit des HA-Peptides auf der Zelloberfläche<sup>[3, 4]</sup>.

**d) Die Optimierung der Oberflächeneigenschaften von *S. cerevisiae* hinsichtlich einer oralen Applikation als Antigen-„Carrier“:** Mit Hilfe des etablierten Expressionssystems wurde die Integrin-

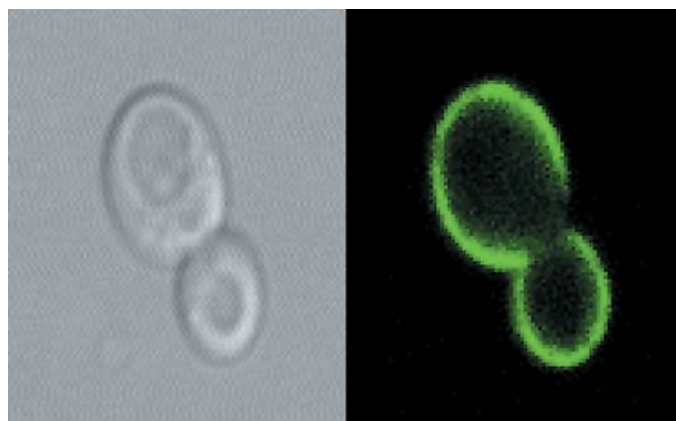
bindende Domäne des Invasins aus *Yersinia enterocolitica* auf der Oberfläche der Bäckerhefe exprimiert. Es wurde ein *in vitro*-System etabliert, mit dessen Hilfe sowohl die Bindung als auch die Aufnahme der rekombinanten Hefen durch humane, nicht-phagozytierende Zellen (HEP-2) gezeigt werden konnte. Die Internalisierung der rekombinanten Hefen beruht dabei auf einer Interaktion der Integrin-bindenden Domäne des Invasins mit  $\beta_1$ -Integrinen der humanen Zellen und erfordert intrazellulär eine funktionelle Polymerisation von F-Aktin<sup>[5]</sup>.

### Literatur

- [1] Heintel, T., Breinig, F., Meyerhans, A. and Schmitt, M. J. Extensive CD8 T lymphocyte responses against various yeast genera in human. *Submitted*.
- [2] Breinig, F., Heintel, T., Schumacher, A., Meyerhans, A. and Schmitt, M. J. Specific activation of CMV-primed human T lymphocytes by cytomegalovirus pp65 expressed in fission yeast. *Submitted*.
- [3] Breinig, F. and Schmitt, M. J. (2002) Spacer-elongated cell wall fusion proteins improve cell surface expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 637–644.
- [4] Breinig, F., Tipper, D. J. and Schmitt, M. J. (2002). Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell* 108: 395–405.
- [5] Breinig, F., Heintel, T., Meyerhans, A. and Schmitt, M. J. Surface-modified yeast cells: a novel bioadhesive carrier for oral application. *Manuscript in preparation*.

### Korrespondenzadresse:

Dr. Frank Breinig  
 Institut für Angewandte Molekularbiologie  
 Universität des Saarlandes  
 D-66041 Saarbrücken  
 Tel.: 0681-302-4709  
 Fax: 0681-302-4710  
 fb@microbiol.uni-sb.de



Expression eines Fremdproteins auf der Zelloberfläche der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. (Nachweis durch Immunfluoreszenz mit FITC-markierten Antikörpern)



Frank Breinig

(Jahrgang 1972) studierte Biologie mit den Schwerpunkten Mikrobiologie/Biotechnologie sowie Biochemie und

Genetik an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken. Diplomarbeit 1998 und Promotion 2002 am Institut für Angewandte Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes bei Prof. Manfred J. Schmitt; seit Januar 2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Angewandte Molekularbiologie.