U. Commandeur¹ · R. Fischer^{1,2}

¹ Institut für Molekulare Biotechnologie, RWTH Aachen

² Fraunhofer IUCT – Molekulare Biotechnologie, Aachen

Transgene Pflanzen als orale Impfstoffe

Grüne Revolution in der Medizin?

Zusammenfassung

Mit den Methoden der molekularen Biotechnologie lassen sich heute bereits therapeutisch wirksame Proteine in Pflanzen herstellen, unter anderen die, die als so genannte essbare Vakzine sowohl zur aktiven als auch zur passiven Immunisierung herangezogen werden können. Zur zeitsparenden Produktion ausreichender Mengen rekombinanter Proteine wurde ein Verfahren entwickelt, bei welchem nur in die Zellen einzelner Blätter, mittels gentechnisch veränderter Agrobakterien, Fremdgene eingebracht werden, anstelle der zeitaufwändigen Aufzucht transgener Pflanzen. Durch eine oral verabreichte Vakzine kann im Körper der Zustand einer umfassenden (systemischen) Immunantwort induziert werden, wobei jedoch im Vergleich zu einer parenteralen Injektion eine häufig vielfach höhere Dosierung des Antigens notwendig ist. In mehreren Tierversuchen konnte bereits die Immunogenität von in Pflanzen produzierten Antigenen nachgewiesen werden. Auch in klinischen Studien mit rekombinanten Antikörpern aus transgenen Pflanzen, so genannten Plantibodies, gegen den Karieserreger *Streptococcus mutans* konnten Erfolge verzeichnet werden. Zukünftige Forschungsschwerpunkte werden sich u. a. mit verbesserten Produktionsmöglichkeiten, der Suche nach geeigneten Pflanzenarten zur Herstellung essbarer Vakzine und dem Phänomen der oralen Toleranz befassen.

Schlüsselwörter

Molekulare Biotechnologie · Essbare Vakzine · Orale Immunisierung · Rekombinante Proteine · Plantibodies

Die Entwicklung und der Einsatz der zurzeit auf dem Markt befindlichen Impfstoffe sind bereits eine moderne Erfolgsgeschichte. Mit ihrer Hilfe wurden im Kampf gegen oft tödlich verlaufende Infektionskrankheiten entscheidende Erfolge erzielt. So konnte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) vor 21 Jahren die Welt offiziell für pockenfrei erklären, und in nicht allzu ferner Zukunft wird dieses Ziel wahrscheinlich auch für die Poliomyelitis (Kinderlähmung) erreicht sein. Durch internationale Impfkampagnen konnten weitere wichtige Infektionskrankheiten – z. B. Diphtherie, Keuchhusten, Masern, Tetanus und Tuberkulose – erfolgreich bekämpft werden. Auch viele ansteckende Magen-Darm-Krankheiten lassen sich heutzutage durch Impfungen verhindern, trotzdem sterben weltweit immer noch mehr als 3 Mio. Kinder jedes Jahr an den Folgen von Durchfallerkrankungen.

„Jährlich sterben 3 Mio. Kinder an Durchfallerkrankungen.“

In den hiervon betroffenen entlegensten und ärmsten Regionen der Erde, häufig gekennzeichnet durch Unterernährung, weiter Bevölkerungsschichten, mangelhafte hygienische Bedingungen und unzureichende medizinische Versorgung, sind effektive Impfstoffe nicht, unzureichend oder nur zu unverträglich hohen Kosten verfügbar. In Pflanzen produzierte essbare Impfstoffe können zwar die widrigen sozio-ökonomischen Bedingungen in den Entwicklungsländern alleine nicht mindern, diese verheißungsvolle neue Technologie kann aber Impfstoffe mit sehr überzeugenden Ei-

genschaften (thermostabil, kostengünstig, vor Ort verfügbar) möglichst vielen Kindern überall in der Welt zugänglich machen.

Warum essbare Vakzine?

Klassische Impfstoffe wie z. B. abgeschwächte Lebend-, Tot- oder synthetische Peptidimpfstoffe sind nicht immer frei von immunologischen Komplikationen. Auch die sichere und dauerhafte Inaktivierung sowie die Massenproduktion human- und tierpathogener Viren und Bakterien bergen ein, wenn auch geringes Restrisiko. Zudem erfordern diese Impfstoffe eine schonende Lagerung in Kühlräumen und einen Transport ohne Unterbrechung der Kühlkette.

Die Produktion essbarer Vakzine (edible vaccines) in Pflanzen bietet hier einige entscheidende ökonomische und qualitative Vorteile. Sofern Pflanzen nicht durch organische Düngung kontaminiert werden, sind sie frei von Mensch- und Tierpathogenen wie z. B. Mikroorganismen, Viren und Prionen sowie onkogenen DNA-Sequenzen. Therapeutisch relevante Fremdproteine können in den Früchten und Speicherorganen (z. B. Samen) produziert und schnell aufgereinigt werden. Bei der Kultivierung, Ernte, Lagerung, Verarbeitung und Distribution der transgenen Pflan-

Dr. Ulrich Commandeur

Institut für Molekulare Biotechnologie, RWTH Aachen, Worringerweg 1, 52074 Aachen,
E-Mail: commandeur@molbiotech.rwth-aachen.de

U. Commandeur · R. Fischer

Transgenic plants as oral vaccines. Green revolution in medicine?

Abstract

With the methods of molecular biotechnology it is possible today to produce therapeutic effective proteins in plants. So called edible vaccines can be used for active immunization as well as for passive immunization. For an efficient production of recombinant proteins a procedure was developed, in which only the leaves are treated with genetically modified bacteria instead of the time consuming regeneration of transgenic plants. With an orally applied vaccine a complete systematic immune response can be induced, but in comparison to a parenteral injection, a 100 times higher dose of the antigen is necessary. The immunogenicity of antigens produced in plants was confirmed in several animal experiments. Clinical studies with recombinant antibodies of transgenic plants against the caries pathogen *Streptococcus mutans* were successful. Future studies will focus on improved production rates, the search for suitable plant species and the phenomenon of oral tolerance.

Keywords

Molecular biotechnology · Edible vaccines · Oral immunization · Recombinant proteins · Plantibodies

Tabelle 1

Eigenschaften von unterschiedlichen Systemen zur Produktion rekombinanter Proteine

Produktion	Transgene Pflanzen	Pflanzenzellkulturen	Bakterien	Hefen	Säugerzellen	Transgene Tiere
Zeitaufwand	Hoch	Mittel	Niedrig	Mittel	Mittel-hoch	Hoch
Produktionskosten	Niedrig	Mittel	Mittel	Mittel	Hoch	Hoch
Produktionsmaßstab	Unbegrenzt	Begrenzt	Begrenzt	Begrenzt	Begrenzt	Begrenzt
Scale-up-Kosten	Niedrig	Hoch ^a	Hoch ^a	Hoch ^a	Hoch ^a	Hoch ^a
Produktivität	Hoch	Mittel	Mittel	Mittel	Mittel	Hoch
Produktqualität und -konformität ^b	Hoch	Hoch	Niedrig	Mittel	Hoch	Hoch
Kontaminationsrisiko	Nein	Nein	Ja ^c	Nein	Ja ^d	Ja ^d

^a Kostenintensive Medienherstellung, teure Anlagen zur Kultivierung und Tierhaltung

^b Proteinfaltung und -glykosylierung

^c Endotoxine

^d Krebsauslösende Sequenzen, Humanpathogene, Prionen

zen kann man in vielen Fällen auf eine bereits bestehende landwirtschaftliche Infrastruktur zurückgreifen. Pflanzen sind relativ leicht genetisch veränderbar und bieten durch großflächigen Anbau eine kostengünstige Quelle für therapeutisch wirksame Proteine [6]. Abhängig von der Pflanzenart können so die Produktionskosten für rekombinante Proteine im Vergleich zur Bakterienfermentation um das 10- bis 15-fache gesenkt werden.

Die Vorteile der Produktion essbarer Vakzine in Pflanzen können genau dort genutzt werden, wo klassische Impfstoffe aufgrund mangelnder finanzieller Ressourcen, fehlender Infrastruktur (Transport und Lagerung) und nicht vorhandenem medizinisch geschulten Personal nur begrenzt einsetzbar sind.

Produktion therapeutisch wirksamer Proteine in Pflanzen

Viele rekombinante, therapeutisch wirksame Proteine werden heutzutage in Säuger- und Insektenzell- oder Gewebekulturen hergestellt. Der Vorteil dieser Expressionssysteme liegt in der korrekten Synthese und Prozessierung der zu produzierenden Säugerproteine, allerdings sind die Ausbeuten nicht immer ausreichend, überaus kostenintensiv und mit hohem technischen Aufwand verbunden (Tabelle 1). Hinzu kommt noch die hohe Empfindlichkeit gegen-

über mechanischer Beanspruchung, die automatisch bei der industriellen Produktion gegenwärtig ist, und die Notwendigkeit der strikten Einhaltung der Kulturbedingungen aufwändiger Produktionsprozesse in den entsprechenden Apparaturen.

Bakterien und Pilze sind im Vergleich zu Säuger- und Insektenzellen wesentlich robuster, als Produktionssystem für rekombinante Säugerproteine erscheinen sie allerdings aufgrund der oftmals fehlenden korrekten Prozessierung von Säugerproteinen als bedingt geeignet [5]. Auch die Faltung komplexer Proteine sowie die Zusammenlagerung diverser Proteinketten ist schwierig und oftmals nicht möglich. Obwohl auch Pflanzen Unterschiede zur Säugerzelle in der posttranslationalen Modifikation exprimierter Proteine aufweisen, sind diese eher gering einzuschätzen und können wahrscheinlich in der Zukunft durch geeignete gentechnische Veränderung der pflanzlichen Biosynthesewege beseitigt werden.

Die Produktion rekombinanter Proteine in Zellkultursystemen erfordert eine zum Teil recht kostenaufwändige Extraktionsprozedur oder aber die Aufreinigung aus dem Kulturüberstand. Dies gilt auch für Pflanzenzellkulturen, in intakten Pflanzen hingegen können die rekombinanten Proteine z. B. im Endosperm des Samens oder in Früchten abgelagert werden und sind so einer leichteren Gewinnung und Aufreinigung zugänglich.

Abb. 1 ◀ **Produktion essbarer Vakzine in transgenen Pflanzen.** (Viruspartikel: mit freundlicher Genehmigung von Dr. Sgro, University of Wisconsin; Partikelkanone, Modell Biolistic PDS 1000-Helium: mit freundlicher Genehmigung Fa. BIO-RAD)

Im Falle von in transgenen Pflanzen produzierten Impfstoffen sollte idealerweise eine Aufreinigung nicht notwendig sein, da sie direkt mit der Nahrung aufgenommen werden können.

Pflanzentransformationssysteme

Zur Produktion essbarer Vakzine in Pflanzen muss zunächst ein geeignetes Antigen des Erregers (hier am Beispiel eines Viruspartikels) identifiziert und das entsprechende Strukturgen in einen

Pflanzentransformationsvektor kloniert werden (Abb. 1a). Nach erfolgreicher Transformation sollte dann das rekombinante Antigen idealerweise in ähnlicher oder gleicher Form wie das natürliche Antigen in der Pflanze exprimiert werden. 2 gebräuchliche und sehr effektive Transformationsmethoden stehen zurzeit für die Herstellung transgener Pflanzen zur Verfügung.

- Die Erste benutzt Agrobakterien, welche natürlicherweise die Fähigkeit besitzen, Teile ihres eigenen Erb-

guts und darin gentechnisch eingebaute Fremdgene in Pflanzenzellen einzuschleusen.

- Die Zweite verwendet DNA-beschichtete, beschleunigte Mikrometallpartikel (Gold oder Wolfram) in der so genannten „Partikelkanone“, um die fremde Erbinformation in die Pflanzenzelle einzubringen und nachfolgend in das Erbgut der Pflanze zu integrieren (Abb. 1b).

In beiden Fällen werden zunächst Explantate des Blattes oder der Knolle entsprechend behandelt, um sie dann in der sterilen Zellkultur in Petrischalen zu regenerieren. Unter Verwendung von Pflanzenhormonen entstehen aus den transformierten Zellen amorphe Zellhaufen (Kalli), aus denen sich im weiteren Verlauf neue Sprosse entwickeln. Diese können dann auf hormonfreies Medium umgesetzt werden, wo es zur Wurzelbildung kommt, danach verlassen die so erhaltenen kleinen transgenen Pflänzchen die Sterilkultur und können im Gewächshaus weiter kultiviert werden. Eine Vielzahl unterschiedlicher Pflanzenspezies konnte bisher auf diese Art genetisch verändert werden, so z. B. die für die Landwirtschaft interessanten Arten Kartoffel, Tomate, Zuckerrübe, Reis, Weizen, Mais, Sojabohne, Banane und Raps.

Ab dem Kallusstadium können die transformierten Zellen auch in eine Suspensionskultur überführt werden, die sich dann hervorragend für die Fermentation von Pflanzenzellen unter kontrollierbaren Bedingungen eignet und somit auch GLP (Gute Laborpraxis)-gerechte Produktionsprozesse erlaubt (Abb. 1b).

Da der gesamte Vorgang der Pflanzentransformation sehr zeitaufwändig ist (bis zu einem Jahr), wurde in unserem Institut eine überzeugend schnelle Methode etabliert, die es erlaubt, in kürzester Zeit ausreichende Mengen rekombinantes Protein zu erzeugen, um eine biochemische Charakterisierung zu ermöglichen und u. U. sogar vorklinische Studien zu betreiben. Bei dieser so genannten Agrobakterieninfiltrationsmethode (Abb. 1b) werden statt ganzer Pflanzen nur deren Blätter in einem Becherglas mit den schon erwähnten genetisch veränderten Agrobakterien versetzt. Unter kurzfristigem Anlegen eines Vakuums gelangen die Bakterien über die Zellzwischenräume in Kontakt mit den Pflan-

Tabelle 2

Aktivimpfstoffproduktion (Antigen) in transgenen Pflanzen

Erreger/Erkrankung	Pflanze	Antigen	Jahr
Hantavirus	Tabak/Kartoffel	S-Antigen des Puumala-Virus	2001 [9]
Tollwutvirus	Tabak/Spinat	Glykoprotein	1995 [5]
Zytomegalovirus	Tabak	Glykoprotein B (UL55)	1999 [18]
Hepatitis-B-Virus	Kartoffel	Oberflächenantigen HBsAg	2000 [15]
	Salat/Lupine	Oberflächenantigen HBsAg	1999 [5]
	Tabak/Kartoffel	Oberflächenantigen HBsAg	1995 [5]
	Tabak	Oberflächenantigen HBsAg	1992 [5]
Norwalk-Virus	Kartoffel	Hüllprotein des Norwalk-Virus	2000 [20]
	Tabak/Kartoffel	Hüllprotein des Norwalk-Virus	1996 [5]
Maul- und Klauenseuche	Alfalfa	Strukturprotein VP1 des MKS-Virus	1999 [25]
	Arabidopsis	Strukturprotein VP1 des MKS-Virus	1998 [5]
Coronavirus	Tabak	Glykoprotein S des Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)	1998 [23]
Obstruktive Bronchitis	Tomaten	F-Protein des Respiratory-syncytial-Virus (RSV)	2000 [17]
Karies	Tabak	Oberflächenprotein von <i>S. mutans</i>	1989 [3]
Typ-I-Diabetes	Tabak/Kartoffel	Diabetesautoantigen	1999 [5]
	Kartoffel	Autoantigen/LT-B-Fusion	1998 [2]
	Tabak	Diabetesautoantigen	1997 [11]
ETEC	Kartoffel	<i>E.-coli</i> -Enterotoxin (LT-B)	1998 [5]
Cholera	Kartoffel	Choleratoxin B (CTB)	1998 [5]

zenzellen und transferieren dann das Fremdgen in den Zellkern. Schon nach etwa 3 Tagen kommt es zur Produktion des gewünschten rekombinanten Proteins [24].

Das Immunsystem der Schleimhaut

Die Oberfläche der Schleimhäute der Atemwege sowie des Verdauungs- und Genitaltraktes bilden das größte immunologisch aktive Gewebe des Körpers. Das Immunsystem der Schleimhaut erzeugt einen effektiven Immunschutz gegenüber eindringenden Pathogenen und verhindert aber auch potenziell gesundheitsgefährdende Immunreaktionen gegenüber inhalierten oder oral aufgenommenen Fremdstoffen (s. orale Toleranz). Nach dem Eindringen eines Antigens in Form von z. B. Bakterien und Viren kommt es neben der ersten humoralen Immunantwort durch Antikörper auch zur Aktivierung von Abwehrzellen und der Bildung von Gedächtniszellen

im Blut- und Lymphsystem. Dadurch entsteht eine umfassende (systemische) Immunantwort des Körpers, ein Zustand der also gerade durch die Verwendung einer essbaren Vakzine erreicht werden kann. Allerdings benötigt man im Vergleich zur Injektion eines Antigens bei der oralen Immunisierung eine etwa 100fach höhere Dosierung und/oder häufigere Dosen des Antigens.

Eine oral verabreichte Vakzine muss v. a. zunächst die extremen Bedingungen (niedriger pH und Proteasen) des Magens überstehen, M-Zellen an der Darmschleimhaut nehmen dann die Impfstoffkomponenten auf und geben sie an das unter der Darmschleimhaut liegende Lymphgewebe weiter. Antigene in Form regelmäßiger partikulärer Strukturen werden dabei offensichtlich effektiver von den M-Zellen aufgenommen als lösliche Proteine. Es ist daher von großem Vorteil, wenn die in Pflanzen produzierten Vakzine die gleiche oder eine möglichst ähnliche Struktur aufweisen wie das natürliche Antigen (Abb. 1a).

**„Orale Immunisierung:
vielfach höhere Dosierung
des Antigens als bei Injektion
notwendig.“**

Die Produktion von sekretorischen Antikörpern des IgA-Typs (sIgA) findet in submukosalen Plasmazellen statt, beim Durchgang durch die Schicht der Schleimhautepithelzellen binden sie spezifisch an Rezeptoren auf deren basolateraler Oberfläche. Dort repräsentieren sie die vorderste Verteidigungslinie des Immunsystems und verhindern durch die Bindung an mikrobielle Adhäsine eine Kolonisierung der Schleimhäute des gastrointestinalen, respiratorischen und urogenitalen Trakts mit Mikroorganismen [3]. Diese Antikörper sind unempfindlich gegenüber dem sauren Milieu im Magen und besonders resistent gegen die für die Verdauung der Nahrung benötigten Proteasen. sIgAs sind hervorragend an die Bedingungen im Magen-Darm-Trakt adaptiert, weshalb sie die bevorzugte Antikörperform einer passiven essbaren Vakzine darstellen (s. „Rekombinante Antikörper und ihr Einsatz in der passiven Immuntherapie“).

Essbare Vakzine

Rekombinante Antigene für die aktive Immunisierung

Das erste Beispiel für die Expression eines Antigens, des Oberflächenantigens A des Karieserregers *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), in Pflanzen und dessen immunogene Wirkung, stammt aus einer europäischen Patentschrift [4]. Durch Beimischung von transgenem Tabakgewebe zur Nahrung von Mäusen wurde bei diesen über die Darmschleimhaut eine Immunreaktion induziert. Obwohl Resistenzuntersuchungen mit dem Erreger selbst nicht unternommen wurden, konnte gezeigt werden, dass die gebildeten Antikörper in immunologischen Tests mit dem natürlichen Erreger reagierten. Es folgten weitere Berichte über die Expression eines Hepatitisantigens in Tabak und Kopfsalat, eines Tollwutvirusantigens in Tomaten, eines Choleraantigens in Tabak und Kartoffeln sowie eines Antigens des Zytomegalovirus in Tabak. In weiteren Tierversuchen konnte

die Immunogenität von pflanzenproduziertem Antigen des Hepatitis-B-Virus aus Tabak und Salat, des Choleraerregers aus Kartoffeln und Tomaten, des Norwalk-Virus aus Kartoffeln und des Maul- und Klauenseuchevirus in Tabak und Spinat nachgewiesen werden (Tabelle 2).

Nachfolgend sollen nun an einigen ausgewählten Beispielen Strategien und Resultate mit in Pflanzen produzierten essbaren Vakzinen erläutert werden.

Pro Jahr sterben weltweit etwa 1 Mio. Menschen an den Folgen einer Hepatitis-B(HBV)-Infektion, und neuesten Schätzungen zu Folge haben 300 Mio. Menschen, v. a. in Asien und Afrika, chronisch verlaufende Hepatitis-B-Infektionen. HBV ist hochgradig ansteckend (100fach ansteckender als HIV), es ist zudem von einer HBV-positiven Mutter bei der Geburt auf das Neugeborene übertragbar, man schätzt allein 20.000 Fälle in den USA pro Jahr. Ungefähr 25% der infizierten Erwachsenen werden zu chronischen Trägern des Virus, 20% dieser Patienten entwickeln im weiteren Verlauf der Erkrankung eine Leberzirrhose oder Leberkrebs [22].

Die Forschung und Entwicklung eines Impfstoffs in transgenen Pflanzen ist mit dem HBV am weitesten fortgeschritten. Der Impfstoff ist ein Untereinheitsimpfstoff (Subunitvakzine), der nur ein bestimmtes Oberflächenantigen (HBsAg) enthält. Erste Ansätze für dessen Herstellung in gentechnisch veränderten Pflanzen gelangen bereits Anfang der 90er Jahre in der Arbeitsgruppe von Charles Arntzen (Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, NY, USA), dem Pionier auf dem Gebiet essbarer Vakzine. Dabei stellte sich heraus, dass die rekombinanten Proteine schon in der Pflanze in Form von Viruspartikeln vorlagen, die strukturell den natürlichen im Serum vorkommenden sehr ähnlich waren (s. auch Abb. 1a). Im weiteren Verlauf ihrer Studien konnten Arntzens Mitarbeiter dann 1995 neben den Erfolgen mit rekombinatem HBsAg in transgenem Tabak [21] das Antigen auch in genetisch veränderten Kartoffeln produzieren [13] und bei Fütterungsversuchen an Mäusen als immunologisch wirksames Antigen nachweisen.

Eine andere Forschergruppe konnte 1999 [8] HBsAg in transgenen Lupinen und Salatpflanzen produzieren. Ein

Teil der freiwilligen Testpersonen, die transgenen HBsAg-Salat zweimal innerhalb von 2 Monaten gegessen hatten, zeigten nach der zweiten Immunisierung ein für den Immunschutz ausreichendes Antikörperniveau.

Die in Tabelle 2 beschriebenen Produktionspflanzen, insbesondere Tabak als Modellsystem, dienen in erster Linie der Grundlagenforschung und Machbarkeitsstudien, sie sind aber nicht unbedingt für die kommerzielle und großtechnische Nutzung geeignet. Für diese Zwecke werden voraussichtlich eher Pflanzen wie Mais, Reis, Weizen, Sojabohne und Raps zum Einsatz gelangen, deren Samen in der Nahrungsmittelindustrie Verwendung finden. Die getrockneten rekombinanten Proteine in den Samen könnten so auch über einen längeren Zeitraum intact erhalten bleiben.

1990 lag die globale Sterblichkeitsrate von Kindern unter 5 Jahren bei 25%. Diese hohe Sterblichkeit trat fast ausschließlich in den Entwicklungsländern auf, wo 85% der Fälle bei Kindern unter 5 Jahren (10,6 Mio. Tote) durch übertragbare Krankheiten, davon wiederum knapp die Hälfte von Durchfallerkrankungen verursacht wurden.

In einer neuen gemeinsamen US-Studie des „National Institute of Allergy and Infectious Diseases“ (NIAD) und des „National Institutes of Health“ (NIH), dem „Jordan Report 2000“ [22], werden Durchfallerkrankungen als die zweithäufigste Infektionskrankheit (16%) in den USA bezeichnet. In manchen Entwicklungsländern durchlaufen Kinder mehr als 12-mal pro Jahr eine Diarrhö, Durchfallerkrankungen sind dort die Ursache für 15–34% aller Todesfälle. Konservative Schätzungen, so der Report weiter, beziffern die Todesfälle durch diese Erkrankungen mit 4–6 Mio. pro Jahr, die allermeisten davon sind Kinder [22].

Bei der Entwicklung essbarer Impfstoffe steht daher die Prävention dieser Krankheiten an vorderster Stelle. Die wichtigsten Verursacher sind Rotaviren, das Norwalk-Virus, der Choleraerreger und bestimmte Stämme des Darmbakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*). Diese Erreger schädigen die Schleimhaut des Dünndarms. Dem damit verbundenen rapiden Wasser- und Salzverlust kann

man zwar durch die Gabe von elektrolythaltigen Infusionen oder Getränken begegnen, die Erkrankungen verlaufen allerdings oft tödlich, wenn diese Gegenmaßnahmen nicht rechtzeitig eingeleitet werden. Ein Impfstoff für den breiten Einsatz in Ländern mit schlechter Infrastruktur ist zurzeit nicht praktikabel. Hier bietet die Produktion essbarer Vakzine in transgenen Pflanzen entscheidende Vorteile.

Das krankheitsauslösende *Toxin des Choleraerregers* besteht aus mehreren Untereinheiten. Die selbst nicht-toxische, an die Darmwand bindende Untereinheit B (Cholera Toxin Subunit B, kurz CTB) dient in Pflanzen exprimiert zur Immunisierung. Für in transgenen Kartoffeln gebildetes CTB konnte bei Fütterungsversuchen mit Mäusen eine CTB-spezifische Antikörperbildung im Serum und in der Schleimhaut nachgewiesen werden. Bei einer herbeigeführten Infektion mit dem Cholera-toxin zeigten die immunisierten Mäuse eine bis zu 60%ige Reduktion der Flüssigkeitsansammlung im Dünndarm, die gleichbedeutend ist mit einem ausreichenden Schutz vor der Infektion [1].

Enterotoxigene *Escherichia coli* (ETEC)-Bakterien sind nach den Rotaviren die zweithäufigste Ursache für Durchfallerkrankungen bei Kleinkindern weltweit. ETEC-Erreger sind verantwortlich für mehr als 400 Mio. Durchfallerkrankungen, aus denen 700.000 Todesfälle bei Kindern unter 5 Jahren resultieren. Darüber hinaus sind ETEC-Bakterien neben anderen bakteriellen und viralen Erregern Ursache für den so genannten Reisedurchfall, wovon jedes Jahr allein 8 Mio. in endemische Regionen reisende US-Amerikaner betroffen sind. Dieser Erreger und die damit verbundenen Durchfallerkrankungen bewirken häufig auch finanzielle Notlagen in den Entwicklungsländern, die sehr stark vom Tourismus abhängig sind [22].

„Entwicklung essbarer Impfstoffe v. a. zur Prävention von Durchfallerkrankungen.“

Die hitzlabile Enterotoxinuntereinheit B (LT-B), das in seiner Funktion dem CTB sehr ähnlich ist, sollte in transgenen Pflanzen hergestellt als Impfstoff dienen. Eine orale Immunisierung der

Tabelle 3

Passivimpfstoffproduktion (Antikörper) in transgenen Pflanzen

Ziel/Erkrankung	Pflanze	Protein	Jahr
Immunglobuline			
Tumorentigen	Tabak	IgG-Antikörper spezifisch für karzinoembryogenes Antigen (CEA)	1999 [24]
Herpes-simplex-Virus	Sojabohne	IgG-Antikörper spezifisch für HSV-2-Glykoprotein B	1998 [5]
Karies	Tabak	sIgA-Antikörper spezifisch für <i>S.-mutans</i> -Oberflächenantigen II	1998 [5]
Karies	Tabak	IgG-Antikörper spezifisch für <i>S.-mutans</i> -Oberflächenantigen II	1994 [5]
Antikörpersekretion	Tabak	IgG-spezifisch für humane Kreatinkinase	1998 [5]
Immunglobulinfragmente			
Morbus Hodgkin	Tabak	scFv eines IgG aus Mäuse-B-Zell-Lymphomen	1999 [5]
Tumorentigen	Reis/Weizen	scFv spezifisch für CEA	2000 [5]

Mäuse mit rekombinantem LT-B, sowohl aus Tabak gewonnenem, als auch durch Fütterung roher Kartoffeln, hat eine dem in Bakterien erzeugten LT-B vergleichbare Immunantwort hervorgerufen [13].

Die erste von der US Food and Drug Administration genehmigte klinische Studie mit einer essbaren Vakzine wurde 1997 durchgeführt. Den Probanden wurden transgene Kartoffeln verabreicht, die die B-Untereinheit des hitzelablen *Escherichia-coli*-Toxins (LT-B) exprimierten [19]. In dieser Studie erhielten 11 Testpersonen 50–100 g rohe, transgene Kartoffeln und 3 Personen 50 g rohe, nicht veränderte Kartoffeln. Die LT-B spezifische Antikörperkonzentration im Serum von 10 Testpersonen war vergleichbar mit den Konzentrationen, die bei Freiwilligen zu messen sind, denen virulente ETEC-Bakterien direkt verabreicht wurden. Dies zeigte, dass in Pflanzen produziertes rekombinantes HBsAg die aggressiven Bedingungen im Verdauungstrakt des Menschen zumindest solange unbeschadet übersteht, dass es in der Lage ist, eine Immunantwort zu induzieren.

Das *Norwalk-Virus*, ein Verursacher von epidemischen Durchfallerkrankungen bei Menschen in Entwicklungs- wie auch Industrieländern, wird durch kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser, sekundär auch durch Personenkontakt übertragen [22]. Transgene Pflanzen produzieren das Hüllprotein des Virus in identischer Form wie das in Insektenzel-

len hergestellte rekombinante Protein. Viel versprechende Ergebnisse mit an Mäuse verfütterten transgenen Tabakpflanzen und Kartoffeln zeigten die Stimulation einer systemischen Immunantwort auf das rekombinante Antigen [14].

Respiratory syncytial virus (RSV) ist weltweit die bedeutendste Ursache für wiederholt auftretende schwere Atemwegsinfekte bei Kindern und Kleinkindern. Die jährliche Infektionsrate beläuft sich auf 64 Mio., die Mortalitätsrate auf 160.000. Schwere RSV-Infektionen können besonders auch immungeschwächte Personen, z. B. nach Organtransplantationen, gefährden, neueste Hinweise zeigen außerdem eine Verbindung zwischen RSV-Infektionen und dem Auftreten von Asthma. Obwohl es in den vergangenen Jahren einige Anstrengungen zur Entwicklung eines effektiven Impfstoffs gab, ist dieser bis heute nicht verfügbar [22]. Sandhu et al. produzierten ein Glykoprotein (F-Untereinheit) des RSV in den Früchten transgener Tomatenpflanzen. Orale Immunisierung von Mäusen mit den transgenen Tomaten erzeugte eine spezifische Immunantwort, was auf eine für die Induktion des Immunsystems ausreichende Menge an pflanzenproduziertem Antigen hindeutet. Die im Serum und in der Schleimhaut gebildeten Antikörper reagierten positiv mit inaktivierten RSV-Virionen, eine Überprüfung der Schutzwirkung durch die gebildeten Antikörper steht allerdings noch aus [17].

Rekombinante Antikörper und ihr Einsatz in der passiven Immuntherapie

Die Alternative zur Stimulation des Immunsystems für die Antikörperproduktion ist die direkte Verabreichung der Antikörper selbst in Form einer passiven Immunisierung.

1989 konnte zum ersten Mal die Produktion eines funktionellen Mausantikörpers in Pflanzen gezeigt werden [7]. Seit dieser Zeit sind mit nicht geringem Aufwand von verschiedenen internationalen Forschergruppen Versuche durchgeführt worden, weitere so genannte „Plantibodies“ in Pflanzen zu produzieren (Tabelle 3). Diese rekombinanten Antikörper können wie die schon beschriebenen Antigene auch in den Samen, Früchten oder Knollen der Pflanze produziert werden, und es sollte damit möglich sein, auch Antikörper in dieser Form zu lagern, zu transportieren und evtl. auch zu verabreichen. Dies stellt, wie bei den Antigenen ausgeführt, einen besonderen Vorteil für Schutzimpfungen in Entwicklungsländern dar.

Rekombinante Antikörper können in Pflanzen als komplette Immunglobuline, Antigenbindungsfragmente (Fab) oder synthetische Einzelkettenfragmente (scFv) und also so genannte mono- oder bispezifische Diabodies produziert werden (Abb. 2). Einzelkettenfragmente und Diabodies sind synthetische Antikörperfragmente, die durch eine Linkersequenz (blau) die variablen Regionen der leichten und schweren Kette translational verbinden. Die Immunglobuline können zudem als chimäre oder humanisierte Antikörper in Pflanzen exprimiert werden. Bei den chimären Antikörpern sind die konstanten Regionen der leichten (C_L) und schweren Kette (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) gegen die entsprechenden Regionen eines Humanantikörpers ausgetauscht, der humanisierte Antikörper besitzt zusätzlich noch in den variablen Regionen der leichten (V_L) und schweren Kette (V_H) humane Aminosäuresequenzen, die die eigentlich für die Bindungsspezifität verantwortlichen Aminosäuresequenzen flankieren. Die dargestellten Antikörperfragmente besitzen die gleichen Bindungseigenschaften wie die monoklonalen Antikörper, von denen sie abgeleitet wurden, sie lassen sich aber in manchen Fällen als Einzelkettenmoleküle einfacher in Pflanzen produzieren, da man auf die zeitaufwän-

Abb. 2 ▲ Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente

digen Kreuzungsprogramme (Abb. 3) verzichten kann. Ihnen fehlen allerdings die Multimerisierungsdomänen und Effektorfunktionen der schweren Ketten, der so genannte Minibody besitzt die Fähigkeit der Zusammenlagerung der schweren Ketten, enthält aber auch die Vorzüge eines Einzelkettenmoleküls (Abb. 2).

Der Bedarf an therapeutischen Antikörpern, z. B. für die Tumorbehandlung, ist groß, allein in den USA werden dafür jährlich mehr als 100 kg benötigt. Für die topische Anwendung in der Immuntherapie von Zahnkaries sind es sogar mehr als 1000 kg pro Jahr. Diese Mengen können durchaus durch die Verwendung transgener Pflanzen, die rekombinante Antikörper produzieren, bereitgestellt werden.

Julian Ma und seine Mitarbeiter produzierten einen Antikörper in Pflanzen, der gegen das Oberflächenantigen des

Karieserregers *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) gerichtet war [10]. Die IgA-Antikörpergene wurden in Tabakzellen transferiert und die Pflanze als Antikörperproduzent herangezogen. Vier unterschiedliche transgene Tabakpflanzen wurden hergestellt, von denen jede eine andere Antikörperkette [leichte (L) Kette, schwere (H) Kette, Joining-Kette (J) und sekretorische (S) Kette] exprimiert. Durch gezielte Kreuzungen der 4 Typen entstand eine Tabakpflanze, die alle 4 Immunglobulingene exprimiert und einen funktionellen sIgA-Antikörper mit einer sekretorischen Kette bildete (Abb. 3). Das sIgA-Molekül ist ein Dimer und besteht aus 2 IgA-Einheiten, die durch eine J-Kette verbunden sind. Zusätzlich enthält sIgA noch eine weitere Proteinkette – die sekretorische Kette – die eine Doppelfunktion ausübt. Zum einen vermittelt sie den Transport des sIgA auf die Schleimhautoberfläche, und zum anderen schützt sie den Antikörper vor dem Abbau durch Verdauungsenzyme, die

auf Schleimhäuten, besonders im Mund, vorkommen [3].

15 freiwillige Probanden nahmen an einer ersten klinischen Studie teil. Eine Gruppe wurde mit einer Antikörperlösung behandelt, die andere erhielt eine Placebolösung [12]. Bei den Teilnehmern beider Gruppen wurden die im Mund vorhandenen Bakterien vor Versuchsbeginn mit einer chemischen Lösung abgetötet. Die Zähne der einen Gruppe wurde jeden Tag mit einer aus transgenen Tabakblättern extrahierten Antikörperlösung behandelt, die der Kontrollgruppe mit einer wirkungslosen Salzlösung. Selbst nach 4 Monaten war bei der positiven Probandengruppe keine Wiederbesiedelung der Zähne durch den Karieserreger nachweisbar, während bei der negativen Kontrollgruppe bereits nach 2 Wochen ein erneuter Befall mit *S. mutans* festgestellt wurde. Wie allgemein bei der passiven Immunisierung werden auch für die topische Immuntherapie wiederholt hohe Dosierungen benötigt, transgene Pflanzen können hilfreich sein, diese Mengen zu produzieren.

Da in dieser Studie die weitgehend ungenießbare Tabakpflanze als Antikörperproduzent diente, wird nun daran gearbeitet, die Antikörpergene in genießbaren Pflanzen (Banane, Tomate, Karotte und Brokkoli) zu exprimieren. Davon müsste der Patient täglich eine ausreichende Menge zerkauen, um einen permanenten Schutz gegen Karies zu erreichen. Eine Alternative wäre, die pflanzlichen Antikörper in Form einer Zahnpasta oder als Mundwasser anzubieten.

Zurzeit sind etwa 20% der US-Bevölkerung mit dem Auslöser des Genitalherpes Herpes-simplex-Virus Typ 2 (HSV-2) infiziert. Jedes Jahr kommen 500.000 Neuinfektionen und 10 Mio. Reinfektionen hinzu. Die Anfälligkeit und Mortalität ist besonders bei immungeschwächten Patienten hoch, auch kann das Virus während des Geburtsvorganges auf das Neugeborene übertragen werden. Darüber hinaus steht HSV-2 im Verdacht, die Übertragung des HIV zu unterstützen. Anders als bei Erwachsenen ist der Infektionsverlauf bei Neugeborenen generell sehr schwer wiegend. Infizierte Kleinkinder (in der USA etwa 1500 pro Jahr) tragen ein etwa 50%iges Risiko für Todesfolge bzw. starke permanente neurologische Schädigung [22].

Abb. 3 ▲ Kreuzungsstrategie zur Erzeugung transgener Pflanzen, die einen aus 4 unterschiedlichen Komponenten bestehenden sekretorischen Antikörper produzieren

Monoklonale Antikörper gegen das HSV-2 wurden in Säugetierzellkulturen und in transgener Sojabohne produziert und deren Eignung für die Immuntherapie verglichen [26]. Die Antikörper der beiden Produktionssysteme zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Wirksamkeit einer Prävention der vaginalen HSV-

2-Infektion bei Mäusen. Therapeutische Antikörper haben sich als effizienter als andere bisher getestete Therapieformen beim Genitalherpes erwiesen. Sie kommen hier in kleinsten Mengen zur Anwendung, deshalb könnte die Produktion dieser Antikörper in Pflanzen zu sehr kostengünstigen Präparaten führen.

Probleme und Lösungswege

Steigerung der Produktionsausbeuten in Pflanzen

Die Entwicklung einer auf transgenen Pflanzen basierenden essbaren Vakzine ist bedeutend schwieriger, als nur ein bakterielles oder virales Gen in das Pflanzengenom zu übertragen (Abb. 1a). Obwohl Proteine in Pflanzen in ähnlicher Art und Weise wie in anderen eukaryotischen Zellen produziert werden, ist eine spezielle Abstimmung der zellulären Maschinerie der Pflanze notwendig, um signifikante Produktionslevel zu erhalten. Zunächst benötigt man einen starken Promotor, der die Transkription und damit die Expression in der Zelle vorantreibt. Viele pflanzenspezifische Promotoren sind bereits beschrieben, und nach weiteren, v. a. auch pflanzeigenen Promotoren wird intensiv gesucht. Auch die DNA-Sequenz des Antigens oder Antikörpers kann für die Expression in Pflanzen optimiert werden. So können z. B. in Pflanzen seltener genutzte Kodons ausgetauscht, der A/T-Gehalt reduziert und mRNA-destabilisierende Bereiche mutiert werden.

Ein weiteres Ziel besteht darin, die Produktion von Fremdproteinen in Pflanzen zu erhöhen, ohne diese gleichzeitig – wie bei der Überexpression des *E.-coli*-Toxins B – in ihrer Entwicklung negativ zu beeinflussen. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu vermeiden, bietet der Transport der rekombinanten Proteine aus dem Zytoplasma in andere Zellkompartimente, z. B. in das endoplasmatische Retikulum, die Vakuole, den periplasmatischen oder Interzellularraum oder in Organellen wie den Chloroplasten [6]. Auch die Verzögerung der Produktion mit Hilfe induzierbarer Promotoren zu einem späteren Entwicklungsstadium bis hin zum Zeitpunkt direkt nach der Ernte wird untersucht.

Die Konzentration des rekombinanten Antigens

Die Bestimmung der für eine effektive Immunisierung notwendigen Antigen/Antikörperdosis ist eine große Herausforderung, zum einen haben Umweltfaktoren wie Licht, Temperatur und Feuchtigkeit Einfluss auf die Konzentration der rekombinanten Proteine in Pflanzen, zum anderen sind auf der Sei-

te der Patienten Faktoren wie Alter, Geschlecht und genetische Veranlagung zu beachten. Durch eine Stapelverarbeitung mehrerer Pflanzen einer Linie – statt der Verabreichung einer einzelnen Pflanze – könnte das Problem der Antigenkonzentrationsschwankung umgangen werden.

Orale Toleranz

Das Phänomen der oralen Toleranz, d. h. der Unterdrückung einer Immunreaktion auf die mit der Nahrung aufgenommenen Antigene und damit auch einer potenziellen Vakzine, wird z. Z. vielfach diskutiert. Orale Toleranz kann auftreten, wenn Fremdproteine zu häufig und in zu hoher Konzentration aufgenommen werden, der Körper kann sich dann an das Fremdprotein gewöhnen und es als „eigenes“ Antigen verstehen. Sollte dieses auch für essbare Vakzine gelten, müsste man evtl. die Einzeldosis erhöhen und gleichzeitig deren Anzahl erniedrigen. Allerdings lässt sich dieses Vorgehen nicht auf jedes beliebige Antigen anwenden, da orale Toleranz von weiteren Faktoren wie Alter und Genetik des Wirtsorganismus abhängig ist. Grundsätzlich sollte daher jede essbare Vakzine und ihr korrespondierendes Antigen individuell auf das Risiko einer oralen Toleranz untersucht werden.

Die Induktion von oraler Toleranz kann aber auch zur Therapie von Autoimmunkrankheiten wie Typ I-Diabetes genutzt werden, dazu benötigt man über einen längeren Zeitraum konstant große Mengen eines Antigens. 1997 produzierten Ma und Mitarbeiter ein diabetes-assoziiertes Autoantigen in transgenem Tabak und Kartoffeln [11]. Das Pflanzenmaterial wurde dann an die besonders gegenüber Diabetes anfälligen Non-obese-diabetic (NOD)-Mäuse verfüttert, die nachfolgend auf das Auftreten von Diabetes untersucht wurden. Nur 2 der insgesamt 12 NOD-Mäuse zeigten typische Krankheitssymptome, wohingegen 8 von 12 Mäusen einer Kontrollgruppe die nicht-transgenes Pflanzenmaterial erhalten hatten, an Diabetes erkrankten. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass sich essbares transgenes Pflanzenmaterial auch hervorragend eignet, größere Mengen eines Autoantigens für die tägliche Nahrungsmittelergänzung zu produzieren, um eine orale Toleranz zu induzieren. Auch multiple

Sklerose und rheumatoide Arthritis könnten in der Zukunft auf diese Art behandelt werden.

Welche Pflanzen?

Zurzeit ist noch nicht klar, welche Pflanzen zur Produktion essbarer Vakzine am besten geeignet sind. Kartoffeln bieten sich zwar an, werden aber in der Regel nicht roh verzehrt. Kochen würde aber die Aktivität der Vakzine verringern, wenn nicht sogar vollkommen eliminieren. Bananen hingegen erscheinen ideal, sie können nicht nur roh verzehrt werden, das Fruchtfleisch bleibt – geschützt durch die Schale – steril, außerdem gehören Bananen zu den gerade von Kindern favorisierten Nahrungsmitteln und sind weltweit zugänglich.

Ein großer Nachteil der Bananenpflanze besteht allerdings in ihrem langsamen Wachstumsverhalten. Zwischen Transformation, Regeneration, Wachstum und Ernte liegen in der Regel mehr als 3 Jahre, im Vergleich dazu benötigt man für dieses Vorhaben bei Kartoffeln und Tomaten gerade mal 1 Jahr. Neben einer schwierigen, bisher nur mit Hilfe der Partikelkanone (Abb. 1b) erreichten Transformations- und Regenerationsprozedur [16] ist zudem die Genregulation in Bananen noch wenig verstanden. Es wird daher zurzeit intensiv nach geeigneten Steuerelementen, Promotoren und anderen regulatorischen DNA-Sequenzen gesucht, die eine effiziente Produktion rekombinanter Proteine in Bananen erlauben.

Fazit

Die Liste der aus biotechnologisch veränderten Pflanzen gewonnenen essbaren Vakzinen wächst stetig an. Nachdem auch die ersten Hürden vorklinischer Studien erfolgreich gemeistert wurden, geben essbare Vakzine Anlass zur Hoffnung, bald sichere und kostengünstige Impfstoffe für Menschen und Tiere in Pflanzen zu produzieren. Die ersten zugelassenen Produkte werden allerdings wahrscheinlich (so Charles Arntzen) bei Nutztieren zur Prävention von Infektionskrankheiten Einzug halten. Aber auch wenn sie für den Menschen verfügbar werden, ist die Vorstellung, diese Pflanzen im eigenen Garten zu züchten oder auf dem benachbarten Feld zu ernten, zurzeit unrealistisch. Arntzen sieht hier zunächst eher den Anbau in Gewächshäusern, die es ermögli-

chen, die biotechnologisch veränderten Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen zu halten und die Produkte von geschultem medizinischen Personal zu verteilen.

Literatur

1. Arakawa T, Chong DK, Langridge WH (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol* 16: 292–297
2. Arakawa T, Yu J, Langridge WH (1999) Food plant-delivered cholera toxin B subunit for vaccination and immunotolerization. *Adv Exp Med Biol* 464: 161–78
3. Baron D (1996) Immunologie – Antikörper, Cytokine, Impfungen. GOVI Pharmazeutischer Verlag, Eschborn
4. Curtiss R, Cardineau GA, Washington University, USA (1989) EP433372A1: Oral immunization by transgenic plants. EP European Patent Office (EPO), Washington University, USA
5. Fischer R, Emans N (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res* 9: 279–299
6. Fischer R, Drossard J, Commandeur U, Schillberg S, Emans N (1999) Towards molecular farming in the future: moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants. *Biotechnol Appl Biochem* 30: 101–108
7. Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342: 76–78
8. Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniowski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki AB (1999) A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *Faseb J* 13: 1796–1799
9. Kehm R, Jakob NJ, Welzel TM, Tobiasch E, Viczian O, Jock S, Geider K, Süle S, Gholamreza D (2001) Expression of immunogenic puumala virus nucleocapsid protein in transgenic tobacco and potato plants. *Virus Genes* 22: 73–83
10. Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, Dolleweerd C van, Mostov K, Lehner T (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268: 716–719
11. Ma SW, Zhao DL, Yin ZQ, Mukherjee R, Singh B, Qin HY, Stiller CR, Jevnikar AM (1997) Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nat Med* 3: 793–796
12. Ma JKC, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, Hein MB, Lehner T (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 4: 601–606
13. Mason HS, Arntzen CJ (1995) Transgenic plants as vaccine production system. *TIBTECH* 13: 388–392
14. Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5335–5340

15. Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol* 18: 1167–1171
16. Sagi L, Panis B, Remy S, Schoofs H, De Smet K, Swennen R, Cammue BP (1995) Genetic transformation of banana and plantain (*Musca* spp.) via particle bombardment. *Biotechnology* 13: 481–485
17. Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS, Osadjan MD, Buetow DE (2000) Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res* 9: 127–35
18. Tackaberry ES, Dudani AK, Prior F, Tocchi M, Sardana R, Altosaar I, Ganz PR (1999) Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine* 17: 3020–3029
19. Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in transgenic potato. *Nat Med* 4/5: 607–609
20. Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ (2000) Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis* 182: 302–305
21. Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen C (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3358–3361
22. The Jordan Report (2000) Accelerated development of vaccines. <http://www.niaid.nih.gov/publications/vaccine/htm>
23. Tuboly T, Yu W, Bailey A, Degrandis S, Du S, Erickson L, Nagy E (2000) Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine* 18: 2023–2028
24. Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Monecke M, Schillberg S, Fischer R (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11.128–11.133
25. Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos MJ, Trono K, Peralta A, Gomez MC, Rios RD, Franzone PM, Sadir AM, Escribano JM, Borca MV (1999) Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology* 15: 347–353
26. Zeitlin L, Olmsted SS, Moench TR, Co MS, Martinell BJ, Paradkar VM, Russell DR, Queen C, Cone RA, Whaley KJ (1998) A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat Biotechnol* 16: 1361–1364

H. Löllgen, E. Erdmann (Hrsg.)

Ergometrie

Belastungsuntersuchungen in Klinik und Praxis

2., vollst. überarb. Aufl.; Berlin Heidelberg, New York: Springer, 2000. 462 S., 108 Abb., 147 Tab., (ISBN 3-540-67320-2), brosch., DM 149,–

Die vorliegende zweite Auflage zeigt sich in einer gut überarbeiteten und aktualisierten Form. Das Buch ist übersichtlich gegliedert in physiologische und pathophysiologische Grundlagen, Methodik der unterschiedlichen Belastungsformen, Bewertung der Basisparameter einer Ergometrie und zusätzlicher Größen wie Nukleotiddiagnostik und Rechtsherzkatheter. Auch geschlechtsspezifische, metabolische Veränderungen und deren Bedeutung für die Beurteilung des Trainingszustandes in der Rehabilitation und Sportmedizin werden ausführlich von Experten auf dem Gebiet diskutiert. Darüber hinaus werden in weiteren Kapiteln spezielle Fragestellungen und Differentialindikationen der Ergometrie in medizinischen, aber auch gutachterlichen Fragestellungen der Arbeits- und Sozialmedizin gegenüber gestellt.

Eine Besonderheit dieses Buches ist die ausführliche und sorgfältige Literaturübersicht und Besprechung. Indikationen, Bewertung und Gegenüberstellung ergometrischer Ergebnisse stellen sich somit aus Publikationen und der Erfahrung der Autoren in einem für die klinische Praxis nützlichen Licht dar. In Zeiten knapper Ressourcen des Gesundheitswesens ist die im Buch enthaltene Kosten-/Nutzenanalyse nicht invasiver und invasiver Diagnoseverfahren wertvoll. Dabei fehlt die Besprechung auch der Kosten-/Effektivitäts- und Kosten-/Nutzwert-Analyse nicht, die erst eine Beurteilung gewonnener Lebensjahre bei optimaler Lebensqualität möglich machen. Trotz der vorwiegend aus dem angelsächsischen Raum kommenden Daten fehlt eine Wertung der einbezogenen Publikationen hinsichtlich „scientific evidence“ ebensowenig wie eine Extrapolierung auf die Gegebenheiten im deutschsprachigen Raum. Hervorzuheben ist auch das wichtige Kapitel über Qualitätsmanagement in der Ergometrie mit Angaben zu Optimierung und Erhaltung der Struktur-, Prozess- und Ergebnisqualität.

Wann soll ich eine Ergometrie durchführen? Wann sind nicht-invasive Verfahren zielführend und wann brauche ich invasive Verfahren? Wie kann ich aus den gewonnenen Daten eine differentialdiagnostische Beurteilung der kardialen Leistungsreserve, koronaren Perfusion, der Lungenfunktion und der metabolischen Kapazität errei-

chen? Auf diese Fragen gibt das Buch umfassende Antwort. Kritisch wird die unzulängliche Durchführung einer Ergometrie zum Beispiel bei submaximaler Belastung und damit die Gefahr der Fehlinterpretation beleuchtet. Leistung ist immer auch durch subjektive Beeinflussung, mangelnde Motivation und individuelles Belastungsempfinden beeinflusst. Deutlich wird gemacht, dass zur richtigen Beurteilung neben der elektrokardiografischen Stromkurve und der einer Missinterpretation offenen Nachschwankungsveränderung auch Herzfrequenz- und Blutdruckverhalten, aber ebenso Sauerstoffverbrauch und Laktatproduktion zählen. Die Spiroergometrie wird damit bei den nicht-invasiven Verfahren zur anamnestic begründeten kardialen, koronaren und pulmonalen Funktionsdiagnostik vor die „einfache“ Ergometrie gereiht.

Die unterschiedlichen Verfahren am Fahrrad, dem Laufband und als sportartspezifische Belastung werden praxisgerecht beschrieben. Die für orthopädische und angiologisch/gefäßchirurgische Patienten gleichermaßen wichtige Armkurbel-Ergospirometrie in der kardiopulmonalen Diagnostik wird nur erwähnt, aber leider nicht näher beschrieben. Zu kurz kommen Aspekte der präoperativen Funktionsdiagnostik bei Risikopatienten und umfangreichen, den Patienten kardiopulmonal belastenden Operationen. Im Lichte zunehmender Alterschirurgie ist es Aufgabe der prä-anaesthesiologischen Evaluierung durch den Anaesthesisten, bei entsprechender Indikation gemeinsam mit konsultierten Fachkollegen auch die in diesem Buch beschriebene Palette nicht-invasiver und invasiver Untersuchungsmethoden zur Beurteilung und für eine risiko-minimierte perioperative Planung richtig zu nutzen.

Das vorliegende Buch ist gleichermaßen niedergelassenen und klinisch tätigen Ärzten zu empfehlen. Dabei sind besonders Fachärzte und Assistenzärzte der Inneren Medizin und der Anaesthesiologie, sowie alle in der Sportmedizin, Trainingssteuerung und kardiopulmonalen Rehabilitation tätigen Ärzte, Pflegekräfte und technische Assistenten die Zielgruppe. Ihnen bietet das Buch wertvolle Hilfe in der täglichen Praxis, im Verständnis kardiopulmonaler und metabolischer Zusammenhänge und bei der Entwicklung wissenschaftlicher Fragestellungen.

W. Lingnau (Innsbruck/Österreich)