



Abb. 2: Gefürchteter Schädling im Obstanbau: die Larve des Apfelwicklers (Bild: DLR Rheinland)

heißen, genau umgekehrt: Hier haben die Insekten-Weibchen den geschlechtsbestimmenden ZW-Typ und die Männchen ZZ.

Wie eine einzige Genveränderung

auf dem Z-Chromosom der Apfelwickler-Weibchen genügt, um sie fast 100.000-fach weniger anfällig für die Infektion durch das Vi-

rus zu machen. Solche hochresistenten Weibchen geben bei der Paarung mit nichtresistenten Männchen das auf ihrem Z-Chromosom sitzende Resistenzgen an ihre männlichen Nachkommen weiter. In der ersten Folgegeneration gibt es nur Männchen, die auf einem ihrer beiden Z-Chromosomen die Resistenz tragen. Unsere Versuche haben nun gezeigt, dass solche Männchen bei einer niedrigen Virusdosis noch in der Lage sind, sich zu verpuppen. Sie überleben also den Einsatz des biologischen Pflanzenschutzmittels und geben ihr Resistenzgen an die nächste Generation weiter. In späteren Generationen entwickeln sich dann aber Männchen, die auf beiden Z-Chromosomen die Resistenz tragen und dadurch ebenso hohe Virusdosen überleben können wie die resistenten Weibchen. Dieser Vererbungsweg ist die denkbar effizienteste Form für die Insekten, um eine Resistenz möglichst schnell zu verbreiten. Wenn der Apfelbauer in solchen Anlagen einen zunehmenden Apfelwicklerbefall feststellt und die Virusmenge erhöht, bewirkt er fatalerweise das Gegenteil: Die Resistenzentwicklung wird beschleunigt und das Gen kann sich rasch in der Insektenpopulation verbreiten. Dank ande-

rer Forschungsprojekte kann aber aufgetatmet werden, denn parallel zur Aufklärung des Vererbungsmechanismus werden seit 2006 neue Virus-Isolate getestet, die die festgestellte Resistenz weitgehend brechen. In diesem Jahr wurden bereits vielversprechende Feldversuche in Deutschland, Italien, Frankreich und in der Schweiz durchgeführt. Um die Wirksamkeit dieser Viruspräparate möglichst lange zu erhalten, wird es wichtig sein, Strategien zum Resistenzmanagement zu entwickeln, wie man sie auch von chemischen Pflanzenschutzmitteln kennt.

Originalveröffentlichung

· S. Asser-Kaiser, E. Fritsch, K. Undorf-Spahn, J. Kienzle, K. E. Eberle, N. A. Gund, A. Reineke, C. P. W. Zebitz, D. G. Heckel, J. Huber, J. A. Jehle
· Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance; *Science*, 28. September 2007

Kontakt

Prof. Dr. David Heckel
Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena
E-Mail: heckel@ice.mpg.de

E. coli Nissle 1917: Vom Kriegsveteran weiterentwickelt zum aktiven Kämpfer gegen Tumoren?

Jochen Stritzker und Aladar A. Szalay

Im Jahre 1917 erhielt der deutsche Arzt und Wissenschaftler Dr. Alfred Nissle ein Patent zum Einsatz des nach ihm benannten Stamms *Escherichia coli* Nissle 1917, den er zuvor aus dem Stuhl eines Soldaten isolierte. Während des Balkankrieges erkrankte dieser Soldat im Gegensatz zu seinen Kameraden nämlich nicht an Durchfall, was A. Nissle auf die von ihm isolierten Bakterien zurückführte. Seither werden diese probiotischen, also gesundheitsfördernden, Bakterien in Deutschland unter dem Namen ‚Mutaflor‘ zur unterstützenden Behandlung von chronischen Darmerkrankungen (z.B. Durchfall, Verstopfung, und *Colitis ulcerosa* in der Remissionsphase) verkauft und eingesetzt. Zudem steigern die Bakterien bei Neugeborenen die körpereigenen Abwehrkräfte und beugen einer Ansiedlung schädlicher Keime im Darm vor.

Seit Mitte der 90er Jahre hat *E. coli* Nissle

1917 auch wieder mehr Beachtung in der Grundlagenforschung bekommen. So wurden beispielsweise verschiedene Oberflächenmoleküle und die Mechanismen der Eisenaufnahme der Bakterien genauer charakterisiert, und der probiotische Charakter der Bakterien konnte in verschiedenen Zellkultur- und Tiermodellen genauer untersucht werden. Zudem wurden bereits erste Erkenntnisse aus der Genomsequenzierung veröffentlicht und mit Genomsequenzen anderer *E. coli* Stämme verglichen (Sun et al, 2005).

Bereits 1891, also einige Zeit bevor Alfred Nissle seinen Bakterienstamm isolierte, wurden von Dr. William Coley Tumorpatienten mit zunächst lebenden, später hitzegetöteten Bakterien behandelt und so teilweise beachtliche Therapie-Erfolge erzielt. Allerdings hat sich die von Coley beschriebene Behandlungsmethode

auch aufgrund der Erfolge von Chemo- und Radiotherapie nicht durchsetzen können. Dennoch sind später immer wieder Versuche durchgeführt worden, um mit Hilfe von Mikroorganismen Krebspatienten zu heilen, wobei der Hauptfokus in den letzten 10 Jahren sicherlich auf so genannten onkolytischen Viren lag. Doch auch Bakterien, und hier vor allem attenuierte *Salmonella typhimurium*-Stämme, haben wieder an Bedeutung gewonnen. So konnte gezeigt werden, dass sie sich nach intravenöser Injektion spezifisch in Tumoren ansiedeln und vermehren, wohingegen die Zahl lebender Bakterien in anderen Organen wie Milz und Leber um einen Faktor von mindestens 1.000 niedriger lag. Darüber hinaus konnten sie im Mausmodell bereits teilweise erfolgreich als Tumorthérapeutikum eingesetzt werden.



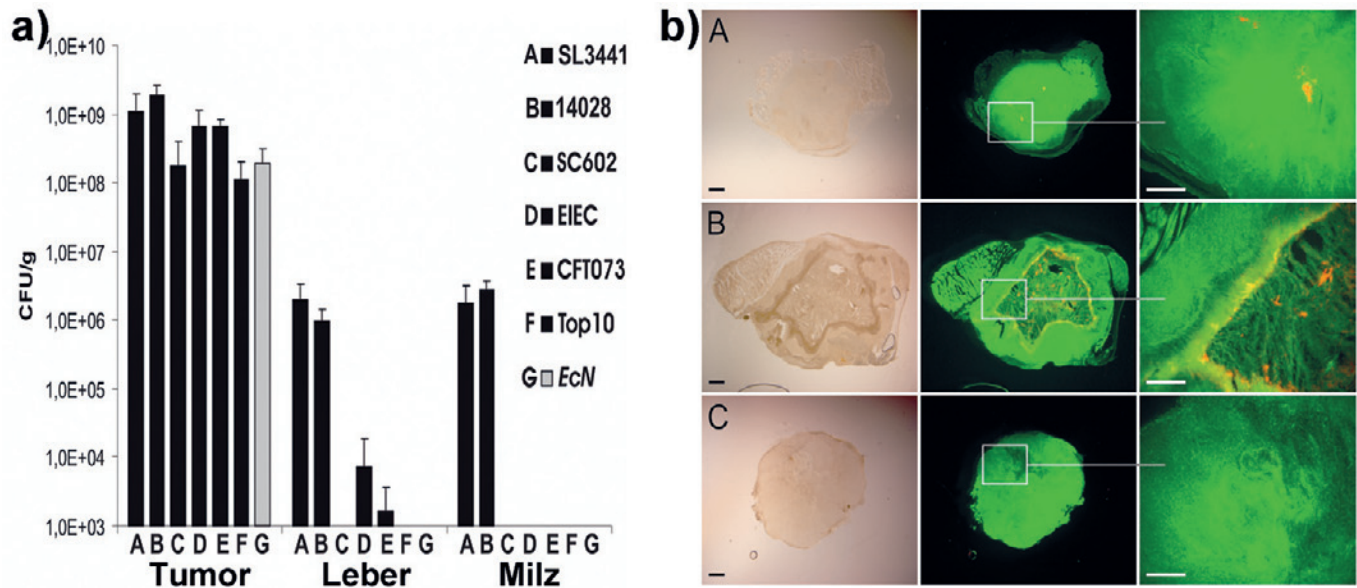


Abb. 1 (nach Stritzker et al, 2007): a) Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (CFU) pro Gramm Tumor-, Leber- und Milzgewebe für die angegebenen Bakterien-Stämme A-G. Tumoren können sowohl von krankheitserregenden (*S. typhimurium* SL1344, *S. typhimurium* 14028, *S. flexneri* SC602, enteroinvasiver *E. coli*-Stamm – EIEC, uropathogener *E. coli*-Stamm – CFT073), wie auch von nicht-pathogenen *E. coli*-Stämmen (*E. coli* Nissle 1917 – EcN und Top10) besiedelt werden. Letztere können in Leber und Milz bereits nach 2 Tagen nicht mehr nachgewiesen werden. b) Verteilungsmuster der Bakterien im Tumorgewebe. In der linken Spalte sieht man Durchlichtaufnahmen von Tumorschnitten einen Tag (A), und 3 Tage (B) nach Injektion von *E. coli* Nissle 1917. Mittlere Spalte: Die Bakterien wurden rot, das Aktinskelett der Tumorzellen grün dargestellt. Aufgrund der Überlagerung beider Aufnahmen erscheinen die Bakterien in der abgebildeten Fluoreszenzaufnahme gelb. Auffällig ist die Bildung einer zentralen nekrotischen Region (deutlich sichtbar als dunklerer Bereich in der mittleren Aufnahme). Diese nekrotische Region lässt sich bei Kontrolltumoren gleichen Alters ohne Bakterien (C) nicht erkennen. Die in der mittleren Spalte umrandeten Bereiche sind in der rechten Spalte in einer höheren Vergrößerung nochmals abgebildet.

Welche Bakterien eignen sich zur bakteriellen Tumorthherapie?

Zur Untersuchung der Mechanismen, die für eine erfolgreiche und gezielte Kolonisierung von Tumoren durch Salmonellen verantwortlich sind, wurden zunächst Bakterien mit ähnlichen Eigenschaften verwendet (Abb. 1a). Bei enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) und *Shigella flexneri* handelt es sich wie auch bei den Salmonellen um fakultativ pathogene Bakterien, die sich intrazellulär vermehren können. Im Gegensatz zu den Salmonellen vermehren sich diese jedoch nicht in einem intrazellulären Kompartiment, dem Phagosom, sondern im Zytosol der Wirtszelle. Im Bezug auf die Tumorkolonisierung hat dieser Unterschied aber keine negativen Auswirkungen, im Gegenteil: Sowohl der EIEC- wie auch der verwendete *S. flexneri*-Stamm können sich sehr gut im Tumor vermehren und zeigen darüber hinaus sogar wesentlich weniger „Hintergrundbesiedlung“ in Leber und Milz. Ähnliches gilt auch für den uropathogenen *E. coli* Stamm CFT073 (UPEC), der sich jedoch im Unterschied zu den bisher diskutierten Stämmen überhaupt nicht intrazellulär repliziert. Noch erstaunlicher sind die Ergebnisse, die mit den nicht-pathogenen Stämmen *E. coli* Top10 (ein typischer Laborstamm) und dem bereits erwähnten *E. coli* Nis-

1917 erzielt wurden. Beide Stämme sezernieren weder Toxine, noch verfügen sie über Virulenzfaktoren und sind trotzdem in der Lage, sich im Tumor anzusiedeln und dort zu vermehren. In Leber und Milz hingegen konnten bei geeigneter Dosis bereits nach 24 Stunden keine Bakterien mehr isoliert werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine erfolgreiche Tumorbeseidung unabhängig ist von den bekannten Virulenzeigenschaften der Bakterien oder ihrer Fähigkeit sich intrazellulär zu vermehren. Daher ist es auch nicht notwendig, auf potentielle Krankheitserreger wie *S. typhimurium* zurückzugreifen, weshalb weitere Untersuchungen mit dem probiotischen Stamm *E. coli* Nissle 1917 durchgeführt wurden. Von besonderem Interesse war dabei die Analyse derjenigen Faktoren, die einen Einfluss auf die Tumorkolonisierung der Bakterien haben.

E. coli Nissle 1917 im Tumor

Unter anderem konnte man so die minimal notwendige Anzahl von etwa 20.000 Bakterien bestimmen, die für eine erfolgreiche Tumorbeseidung nötig sind. Von den injizierten Bakterien sind jedoch weniger als 0.1% in der Lage, sich im Tumorgewebe festzusetzen und zu vermehren. Aus dieser geringen Zahl entstehen dann

innerhalb von nur 1-2 Tagen etwa eine Milliarde lebensfähiger Keime pro Gramm Tumorgewebe. An dieser Konzentration ändert sich über die nächsten 3 Wochen kaum etwas, wobei es dabei keinen großen Unterschied macht, ob die tumortragenden Mäuse ein voll funktionsfähiges oder ein gehemmtes Immunsystem besitzen. Dies ist wahrscheinlich auf die im Tumor stark reprimierte Immunantwort zurückzuführen, die es auch so schwierig macht, erfolgreich mit einer Immuntherapie gegen Tumoren vorzugehen.

Interessant ist auch das Verteilungsmuster, das die Bakterien innerhalb des Tumors einnehmen (Abb. 1b). Zunächst reichern sich die Bakterien am ersten Tag nach der Injektion in kleinen, möglicherweise nekrotischen Zonen des Tumors an. Im Laufe der nächsten 2 Tage wird in den Zentren des kolonisierten Tumors eine große, nekrotische Region von absterbenden (Tumor-)Zellen ausgebildet, an deren Übergang zum lebenden Gewebe *E. coli* Nissle 1917 konzentriert vorliegt. In Kontrolltumoren, in denen keine Bakterien vorliegen, entsteht keine derartige nekrotische Region, so dass davon auszugehen ist, dass diese von den Bakterien verursacht wird. Möglicherweise handelt es sich einfach um eine Konkurrenz der Bakterien mit den Tumorzellen um vorhandenen Sauerstoff. Aufgrund der

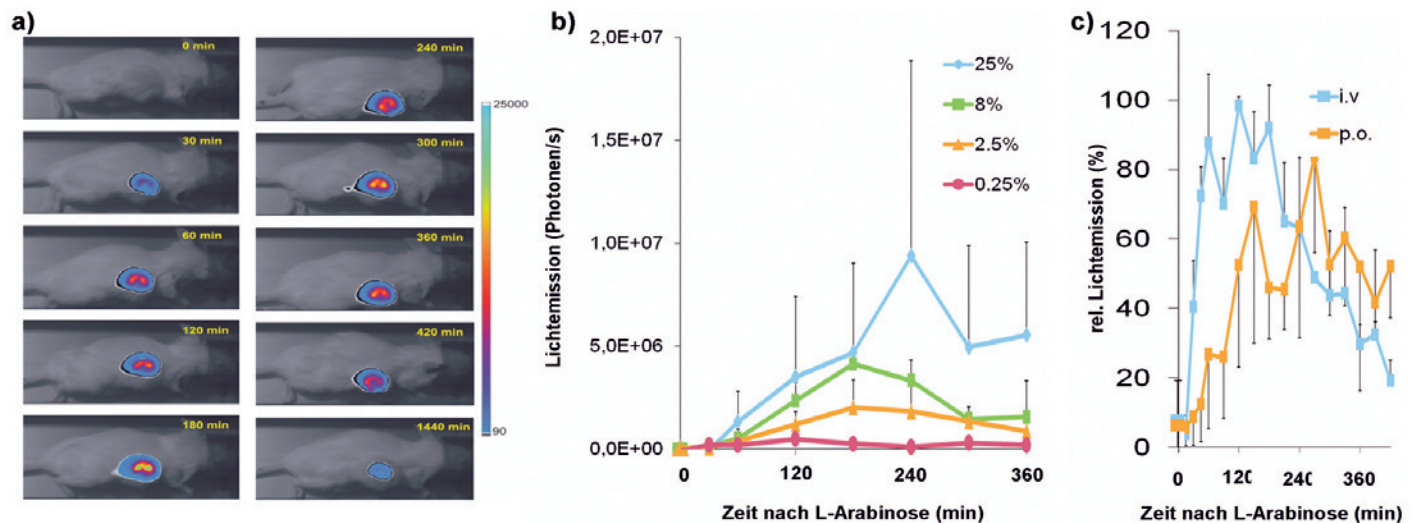


Abb. 2 (nach Stritzker et al, 2007): a) Mit *E. coli* Nissle 1917 besiedelte Tumoren senden nach der Gabe von L-Arabinose Licht aus, welches mit einer sensitiven CCD-Kamera detektiert und quantifiziert werden kann. Die so erhaltenen Bilder lassen sich dann mit „normalen“ Fotografien der gleichen Maus überlagern, um den Ort der Lichtemission genau festlegen zu können. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die verstrichene Zeit nach L-Arabinose Zugabe. b) L-Arabinose-induzierte Lichtemission. Unterschiedliche Konzentrationen von L-Arabinose bewirken unterschiedlich starke Genexpressionsraten – dies lässt sich anhand der Menge des ausgesendeten Lichts verdeutlichen. c) Unabhängig von der Verabreichungsart der L-Arabinose (i.v. – intravenös, oder p.o. – über den Verdauungstrakt) kann man die bakteriellen Gene anschalten. Die orale Gabe des Zuckers führt jedoch zu einer leichten Verzögerung im Vergleich zur intravenösen Injektion.

hohen Stoffwechselaktivität der Bakterien kommt es dann zu einem Abfall des Sauerstoffpartialdrucks, den die tierischen Zellen – im Gegensatz zu *E. coli* Nissle 1917 – nicht überleben können. Da sich die nekrotische Region nach 3 Tagen jedoch nicht weiter ausweitet, entsteht im Lauf der Zeit wahrscheinlich ein Gleichgewicht zwischen der Zufuhr von Sauerstoff (und anderen Metaboliten) durch die vorhandenen Blutgefäße und dem Verbrauch durch die Bakterien. Überraschenderweise hat die Ausbildung der nekrotischen Region jedoch keinen Einfluss auf das Tumorstadium und es konnte in dem verwendeten Tumormodell auch kein therapeutischer Effekt durch *E. coli* Nissle 1917 beobachtet werden. Dies mag daran liegen, dass das verwendete Tumormodell äußerst aggressiv ist. In zukünftigen Studien wird es daher interessant sein zu beobachten, ob beispielsweise mit *S. typhimurium* Behandlungserfolge erzielt werden können (so wie es in anderen Tumormodellen der Fall war). Wenn dies der Fall sein sollte, wird der Vergleich der Genomsequenzen möglicherweise weitere Aufschlüsse darüber geben, welche Gene für therapeutische Erfolge wichtig sind.

Kontrollierte Steuerung der Genexpression durch Zucker

Alternativ kann man auch darüber nachdenken, therapeutisch wirksame Gene in *E. coli* Nissle 1917 einzubringen. Deren Funktion könnte dann so zur Tumorbekämpfung ausgenutzt wer-

den. Da eine zu hohe Expression solcher Gene sich ebenso negativ auf den gesamten Organismus auswirken könnte wie die Expression am falschen Ort, muss gewährleistet sein, dass diese Gene – am besten von außen – sehr gut reguliert werden können. Dies konnte durch die Zuhilfenahme des Arabinosepromotors erreicht werden. Dieser Promotor wurde bereits in früheren Studien an Bakterienkulturen zur Regulation von bakteriellen Genen eingesetzt und wurde deshalb auch in dem verwendeten *E. coli* Nissle 1917 in unserem Labor getestet. Zur Bestimmung der Genexpressionsrate in den genetisch veränderten Bakterien wurden als sogenannte Reportergene die Gene für die Luciferase aus dem Bakterium *Photobacterium luminescens* unter Kontrolle des Arabinosepromotors gestellt. Nach der Zugabe des Zuckers L-Arabinose in das Kulturmedium bewirkt die Expression dieser Gene das Aussenden von Licht, welches mit einer hochempfindlichen CCD-Kamera registriert werden kann. Wird der so veränderte *E. coli* Nissle 1917 Stamm in tumortragende Mäuse injiziert, sieht man zunächst keine Lichtemission. Wird den Mäusen jedoch L-Arabinose appliziert, so kann bereits 30 Minuten nach Verabreichung eine Lichtemission aus dem Tumorgewebe detektiert werden (Abb. 2a). Das Signal erreicht dann nach etwa 2-4 Stunden sein Maximum und wird anschließend langsam wieder schwächer. Es ist also möglich, ein Gen zu einem vom Experimentator festgelegten Zeitpunkt einzuschalten. Zudem lässt sich über die Menge der injizierten L-

Arabinose die Stärke und Dauer der Expression steuern, so dass eine Überexpression verhindert werden kann (Abb. 2b). Da L-Arabinose für den Menschen nicht giftig ist und auch kurz nach dem Verzehr in die Blutbahn gelangt, ist es sogar denkbar, später einmal die Genexpression mit Hilfe von mit L-Arabinose gesüßten Speisen oder in Form von Süßigkeiten zu steuern, sollten Bakterien wirklich einmal Einzug in die Krebstherapie erhalten.

Originalpublikation

· Stritzker J, Weibel S, Hill PJ, Oelschlaeger TA, Szalay AA. Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in live mice. *Int J Med Microbiol.* 2007 Jun;297(3):151-62.

Referenz

· Sun J, Gunzer F, Westendorf AM, Buer J, Scharfe M, Jarek M, Gössling F, Blöcker H, Zeng AP. Genomic peculiarity of coding sequences and metabolic potential of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inferred from raw genome data. *J Biotechnol.* 2005 May 4;117(2):147-61.

Kontakt

Jochen Stritzker und Aladar A Szalay, Biozentrum der Universität Würzburg, Raum B110, Am Hubland, 97074 Würzburg
E-Mails: jochen.stritzker@biozentrum.uni-wuerzburg.de und aladar.szalay@virchow.uni-wuerzburg.de