

III. Ergebnisse

Gelbfieber ist eine lang bekannte, impfpräventable Infektionskrankheit. Trotzdem ist nach wie vor unklar, welche Mechanismen zu einem lang anhaltenden Impfschutz führen und was die Gründe für das Zustandekommen von Impfwischenfällen (YEL-AE) sind. Durch vergleichende Studien von Personen mit Wildtypinfektionen (YFV_{Inf}), von YEL-AE und von Impfungen ohne Impfkomplicationen sollen die dafür verantwortlichen Phänomene näher untersucht werden.

III.1 Nachweis von Gelbfieberviren

Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche Techniken und Ansätze zum Nachweis von Viren entwickelt.

Bei den verschiedenen Techniken ist es daher umso wichtiger, die geeignete Methode bzw. Frage zu einer Patienten-Probe (oder einem diagnostischem oder therapeutischen Problem) zu stellen, da der Nachweis von Virusaktivität, des genomischen Materials, des Antigens oder der produzierten Antikörper jeweils andere Interpretationen der Krankheitssituation ermöglicht.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Nachweismethoden:

- Direkt: Isolierung und Darstellung des Virus per se
- Indirekt: Reaktion des Wirts nach einem Kontakt mit dem Erreger

In der vorliegenden Arbeit werden beide Nachweismethoden je nach Fragestellung eingesetzt.

III.1.1 Nachweis der Nukleinsäure

III.1.1.1 Die RT-Reaktion

Bevor der Nachweis durch die quantitative Real-Time-TaqMan-PCR (TaqMan-PCR) erfolgte, musste die virale RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Ferré et al. [1994] beschreiben, dass die reverse Transkription hohe Schwankungen in der Effizienz (5-95 %) haben kann, daher wurde eingangs die

reverse Transkription der YFV-RT-PCR getestet. Dazu wurde die cDNA-Konzentration von zehn unabhängigen RT-PCR-Reaktionen zweier Assays (NS3 und 3UTR) in Doppelbestimmungen untersucht (Tabelle III.1). Dabei wurden jeweils die gleichen Reagenzien einer Firma verwendet und die Reaktion an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

TABELLE III.1:
Zehnmalige Reverse Transkription aus einer Probe und anschließende TaqMan-PCR

Reaktion	NS3			3UTR		
	C _T	MW	STABW	C _T	MW	STABW
1	20,14			19,49		
	20,18	20,16	0,03	19,07	19,28	0,30
2	20,22			19,60		
	19,89	20,06	0,23	20,06	19,83	0,33
3	20,30			19,75		
	20,44	20,37	0,10	19,80	19,78	0,04
4	20,34			20,05		
	20,25	20,30	0,06	20,06	20,06	0,01
5	21,41			19,41		
	21,43	21,42	0,01	20,06	19,74	0,46
6	19,72			20,02		
	19,45	19,59	0,19	19,00	19,51	0,72
7	19,90			19,30		
	19,60	19,75	0,21	20,03	19,67	0,52
8	20,08			19,27		
	20,01	20,05	0,05	19,80	19,54	0,37
9	19,89			19,86		
	20,22	20,06	0,23	20,21	20,04	0,25
10	20,07			20,06		
	19,63	19,85	0,31	19,50	19,78	0,40
Gesamt						
MW	20,16			19,72		
Gesamt						
STABW	0,51			0,37		

Schwellenwertzyklus (C_T), Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) zeigen die gute Reproduzierbarkeit der RT-Reaktion. Die Reaktionen sind jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt worden.

Die Varianz der C_T-Werte (Schwellenwertzyklus) in den gewählten RT-PCR-Bedingungen mit dem genutzten Enzym ist sowohl in den Doppelbestimmungen als auch unter den zehn Reaktionen im Gegensatz zu den Daten von Ferré et al. [1994] gering, was vermutlich an der besseren Qualität der heute erhältlichen Transkriptase liegt. Dabei weist der 3UTR-Assay etwas bessere Werte hinsichtlich der Varianz auf. In der Arbeit wurden für alle RT-PCRs diese Bedingungen genutzt.

III.1.1.2 Die TaqMan-PCR

Zwei quantitative TaqMan-PCR Assays für die Detektion von Gelbfiebereviren wurden auf die bereits bestehende Gelbfieber TaqMan-PCR [Bae, 1999] weiterentwickelt und verbessert. Die dafür verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle III.2 aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden an Hand der Sequenz des Gelbfieberstammes 17D (Genbank Accession Nr. X03700) konzipiert. Die Schmelztemperatur wurde mit der „Nearest Neighbour“ Methode errechnet [Breslauer et al., 1986].

TABELLE III.2:

Sequenz, Genomlokalisierung und Annealing Temperatur der Oligonukleotide, die für die TaqMan-PCR genutzt wurden

	Sequenz der Primer / TaqMan-Sonde	X03700	T _m [°C]
NS3 s	AggTCCAgTTgATCgCggC	4857-4875	62,1
NS3 as	gAgCgACAgCCCCgATTTCT	4961-4942	62,2
NS3 TM	F-TggTCAACgTCCAgACAAAACCgAgC I Tg p	4893-4921	71,7
3' UTR s	AACCCACACATgCAggACAA	10109-128	58,8
3' UTR as	gTTgCAggTCAgCATCCACA	10337-318	59,1
3' UTRb s	TgTgCggATCACTgATTggA	10185-204	58,1
3' UTRb as	CggTTATTCTgTTAgATggTgTT	10378-355	57,0
3' UTR TM	F-CCATTTAgTCATCCATCgTATCCgAACgC I p	10237-266	68,2

Abkürzungen: F: 6-Carboxyfluoreszein am 5' - Ende (FAM), und T: 5-Carboxytetramethylrhodamin (5-TAMRA) am 5' - Ethylamino-d-Thymidin, s: sense, as: antisense, TM: TaqMan-Sonde, T_m: Schmelztemperatur.

Um die Quantifizierung der genomischen Virus RNA zu erlauben, wurde pro Assay eine Standardkurve generiert, die durch die Amplifikation definierter Verdünnungsstufen der Plasmide pYFVNS3amp und pYFV3UTRamp erhalten wurde. Die C_T Werte wurden vierfach bestimmt und gegen die Plasmid-Kopiennummer aufgetragen. Abbildung III.1 zeigt die Standardkurven des NS3- und des 3UTR-Assays. Der 3UTR-Assay hat zwei mögliche Primerpaare, die beide gleichermaßen gut genutzt werden können. In dieser Abbildung wurde der Einfachheit halber nur das eine Primerpaar berücksichtigt. Die PCR-Effizienz beider Assays beträgt 98,7 %. Die Detektionsempfindlichkeit folgt zwischen 10¹ und 10⁸ Plasmiden einer linearen Abhängigkeit. Der hohe Korrelationskoeffizient von nahezu 1 (R²=0,999) spiegelt die sehr hohe Wechselbeziehung zwischen Zyklenzahl und Plasmidkopienzahl beider Assays wider. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde durch wiederholte Ansätze von jeweils drei zehnfach Verdünnungen der jeweiligen Standard-Plasmide und durch je drei zehnfach

Verdünnungen von drei verschiedenen Gelbfieberevirusimpfstoffchargen an unterschiedlichen Tagen durchgeführt (Abbildung III.2).

Die Intra- und Inter-Assay Präzision (Streuung um den experimentellen Mittelwert) war sowohl für die Plasmidverdünnungen als auch für die verschiedenen Impfstoffchargen sehr gut (Intra-Assay Präzision: <13% für Plasmidverdünnungen, <20% für Impfstoffproben; Inter-Assay- Präzision für beide Assays lag bei <30%) und nur bei sehr geringen Kopienzahlen (zehn Plasmidkopien) zeigte sich eine etwas verringerte Präzision (jeweils <34%). Obwohl in diesen Fällen die Reproduzierbarkeit der Messung bei geringer Kopienzahl nahe am Detektionslimit lag, konnten dennoch 100 % der Proben, die nur 10 Plasmidkopien pro Assay enthielten, positiv detektiert werden. Dies spricht für eine sehr hohe Zuverlässigkeit der beiden Assays, selbst in den niedrigsten Konzentrationen, wo nach Peccould und Jacob [1996] bei niedrigen Kopienzahlen (unter 20 Kopien pro Reaktion) die zufällige Variation infolge des Probenfehlers („Poissons error law“) signifikant wird.

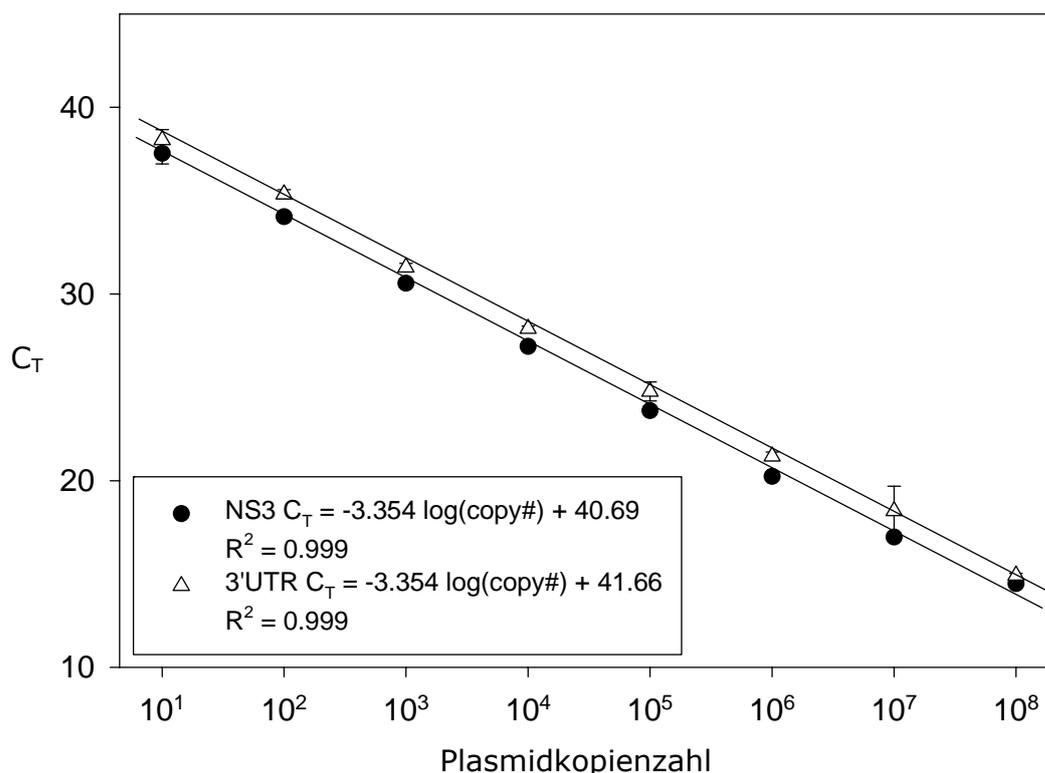


Abbildung III.1: Standardkurve zweier unabhängiger TaqMan-PCR Assays NS3 (schwarze Kreise) und 3'UTR (offene Dreiecke). Die Plasmidkopienzahlen sind gegen die C_T Werte aufgetragen. Die Steigung indiziert die PCR Effizienz von >98.7% für beide Assays. Copy#: Kopienzahl, R^2 : Regressionswert.

Um zu sehen, inwieweit diese Assays auch in der Diagnostik eingesetzt werden können, wurden Proben von YFV-freier Zellkultur, Proben von YFV-haltiger Zellkultur, Proben gesunder Personen und Proben eines Patienten mit fulminantem Gelbfieberverlauf auf das Vorhandensein von YFV untersucht. YFV-freie Proben aus Zellkultur, als auch Proben gesunder Personen waren negativ in allen PCR-Reaktionen. Außerdem gab es keine Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren (Japan Enzephalitis, FSME, West Nil Virus und Dengue 1-4). Die Proben YFV-haltiger Zellkultur unterschiedlicher Konzentrationen war YFV-positiv. Die Proben (Seren) der letzten drei Tage bis zum Tod des Patienten mit fulminantem Gelbfieberverlauf wurden auch YFV-positiv getestet und zeigten einen Abfall des Virustiters von 1.6×10^8 GE/mL Serum auf 9.5×10^6 GE/mL Serum. Die beiden TaqMan-PCR Assays können somit in der Diagnostik eingesetzt werden.

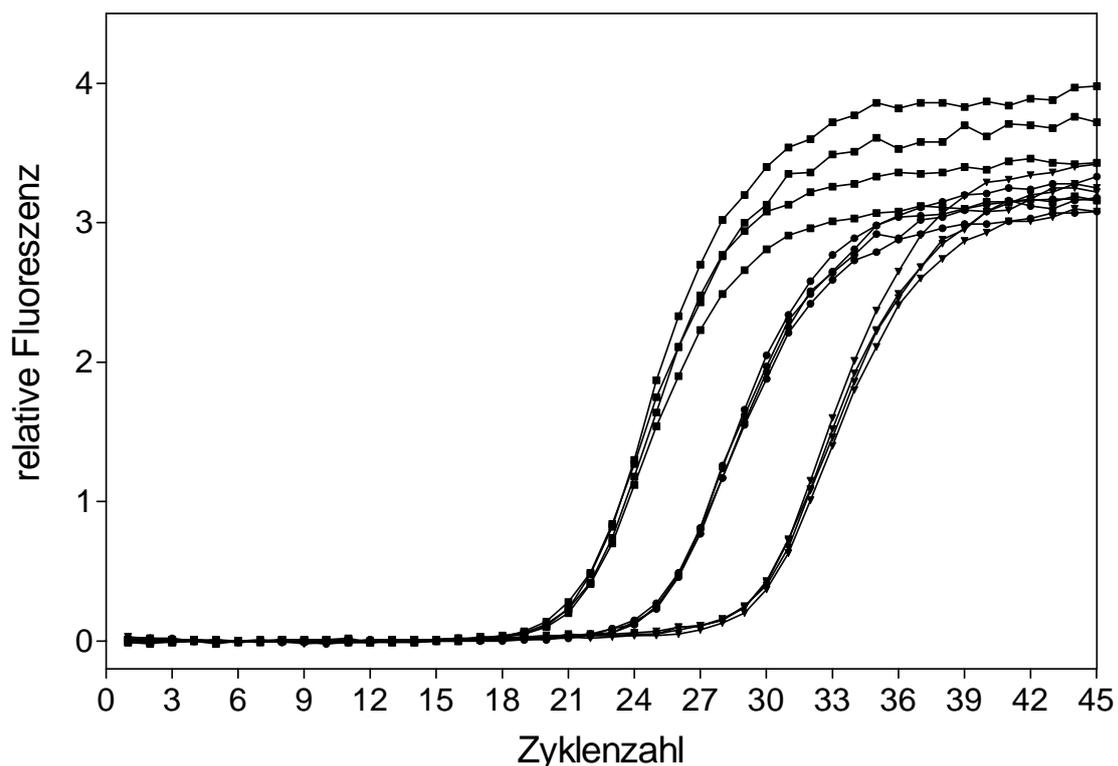


Abbildung III.2: Repräsentativer "Amplification Plot" vom NS3-real-time PCR Assay. Drei serielle zehnfache Verdünnungen vom YFV-17D (Charge 189) wurden 4-fach bestimmt. Die minimalen Veränderungen in den C_T -Werten zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit dieser PCR. ■: 1:10, ●: 1:100 ▼: 1:1000.

Die oben beschriebene reverse Transkription wurde im Laufe der Arbeit in die TaqMan-PCR als „One Step-RT-PCR“ integriert. Dabei wurde ausgehend vom

Protokoll der Hersteller (Qiagen, Invitrogen) zum einen das Reaktionsvolumen um die Hälfte (25 μ L) reduziert, sowie die Reaktion mit nur einem Viertel der laut Herstellerangaben benötigten Enzymmenge optimiert. Der Vergleich zu der reversen Transkription mit anschließender TaqMan-PCR zeigte, dass die One Step-RT-PCR neben der Zeitersparnis eine vergleichbare Sensitivität und Reproduzierbarkeit zeigt, wobei in geringen Konzentrationen die Sensitivität des ersteren Zwei-Schritt-PCR-Ansatzes besser ausfällt (Daten nicht gezeigt).

III.1.1.3 Referenzgenanalyse

Der Nachweis viraler Nukleinsäure in Zellkulturen erfolgte nicht absolut, sondern relativ in Bezug zu einem internen Referenzgen. Dabei erhält man das Verhältnis der Kopien des untersuchten Genomabschnitts je Kopie Referenzgen [Livak und Schmittgen, 2001]. β -Aktin ist ein bevorzugtes Referenzgen, das oftmals als interner Standard benutzt wird [Sturzenbaum und Kille 2001]. In aktuellen Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass dieses Gen nicht immer eine geeignete Referenzkontrolle für die quantitative Expression von RNA in Zellen darstellt, da die Expression infektionsabhängige Variationen zeigte.

In Zusammenarbeit mit Aleksandar Radonic wurden zehn Referenzgene, in mit Viren verschiedener Familien infizierten Zelllinien gemessen. Eine Quantifizierung der viralen RNA wurde mittels TaqMan-PCR durchgeführt, um die Infektion verfolgen zu können. Die Referenzgene wurden mit BestKeeper (BK), GeNorm und mit dem Algorithmus „BK vs. Referenzgen“ nach Radonic et al. [2004] evaluiert.

TABELLE III.3:
Ergebnisse der BestKeeper, GeNorm und $\Delta\Delta C_T$ Analyse

	BestKeeper Analyse, SD [$\pm C_T$]	BK Analyse, BK vs. Referenzgen Kandidat	GeNorm Analyse ($M \leq 0,5$)	$\Delta\Delta C_T$ Analyse
RPII	1,36	0,90 (0,001)	1,65	9,01
Act	3,06	0,91 (0,001)	3,69	14,25
β2M	1,07	0,96 (0,001)	1,32	5,78
L13	0,67	0,25 (0,492)	1,87	2,90
PLA	1,64	0,98 (0,001)	2,02	9,62
TBP	0,71	0,94 (0,001)	1,30	4,24
GAP	1,08	0,99 (0,001)	1,31	6,35
PPI	0,56	0,92 (0,001)	1,39	3,14
G6P	0,80	0,93 (0,001)	1,31	5,42
Tub	1,19	0,92 (0,001)	1,48	7,48
BK	0,98			
Sum_{RGC}	12,16		17,34	68,17

HepG2-Zellen wurden mit YFV mit einem MOI von 0,5 infiziert. 96h nach Infektion waren >80% der Zellen infiziert (Nachweis mittels Immunfluoreszenztest). Folgende Zeitpunkte wurden gemessen: 0, 24, 48, 72, 96 Stunden nach Infektion. SD [$\pm C_T$]: Standardabweichung vom C_T -Wert, BK: BestKeeper, Sum_{RGC}: Summe der Referenzgen Werte.

In Tabelle III.3 sind die Ergebnisse der mit YFV-infizierten Zellen dargestellt. Die Daten anderer Viren [Radonic et al., 2004] wurden hier nicht weiter berücksichtigt.

Trotz fortschreitender Virusreplikation bleibt die Expression einiger Referenzgene (L13, PPI und TBP) konstant, wohingegen andere Gene in ihrer Expression entsprechend der Akkumulation der infizierten Zellen variieren.

Bei der BestKeeper Analyse steht eine niedrige Standardabweichung der C_T -Werte für brauchbare Referenzgene und eine hohe Standardabweichung für Gene, die sich von der Virusreplikation beeinflussen lassen.

Die hier ermittelten Werte für Aktin sind sehr hoch, so dass das Aktin-Gen als Referenzgen ungeeigneter erscheint. Dagegen indizieren die Werte bei L13, PPI und TBP eine höhere Expressionsstabilität. Wenn man die BestKeeper Werte gegen jedes Referenzgen mit der Pearson-Korrelation rechnet, dann zeigt sich für Infektion mit Gelbfieber, dass auch hier der Mittelwert von β -Aktin relativ hoch liegt. Bei der Analyse mit GeNorm erweisen sich TBP und PPI auch hier als verlässliche Referenzgene, doch auch GAP, G6P und β 2M zeigen ähnlich gute Werte. β -Aktin ist nach diesen neueren Untersuchungen das am wenigsten geeignete Referenzgen der analysierten Gene. Wenn man die Kalkulation nach Radonic et al. [2004] auf der Basis von $\Delta\Delta C_T$ durchführt, dann zeigt sich auch hier, dass β -Aktin stärkeren Expressionsschwankungen unterliegt als andere untersuchte Gene. Die Gene mit den niedrigsten $\Delta\Delta C_T$ -Werten sind L13, PPI und TBP.

Da ein Großteil der Ergebnisse dieser Arbeit mit β -Aktin als Referenzgen durchgeführt wurde, war es erforderlich auch alle weiteren Versuche in dieser Arbeit mit β -Aktin als Referenzgen durchzuführen, um die Vergleichbarkeit zu früheren Ergebnissen und zu anderen viralen Nukleinsäurequantifizierungen, die mittels quantitativer PCR bestimmt wurden zu gewährleisten. Für nachfolgende Untersuchungen sollten jedoch eines der verlässlicheren Gene (Tabelle III.3) als Referenzgen zusammen mit β -Aktin verwendet werden.

III.1.1.4 Der Plaque-Assay und seine Korrelation mit der TaqMan-PCR

Bei der Virustitration [verändert nach De Madrid and Porterfield, 1969] wird die Menge an infektiösem Virus bestimmt und angegeben in infektiösen Einheiten (plaque forming unit, PFU). Hierdurch lassen sich u.a. Aussagen über den

Infektionsverlauf treffen, wobei ein Plaque auf ein infektiöses Partikel zurückgeht.

Die Untersuchung bezüglich des Vergleiches zwischen dem aufwendigeren Plaque-Assay mit der TaqMan-PCR sollte Aufschluss darüber geben, inwiefern die Daten der beiden Methoden korrelieren. Dazu wurden die gleichen Proben von verschiedenen Gelbfieber Konzentrationen mit dem Plaque-Assay und der NS3-spezifischen TaqMan-PCR untersucht. Allgemein lässt sich sagen, dass die Anzahl der viralen Genome, die durch die TaqMan-PCR bestimmt wurden um 1000 bis 5000-fach höher lag als die Anzahl an infektiösen Partikeln. Die virale Konzentration gegen die Anzahl der Plaques aufgetragen ergab eine Korrelation von $R=0,88$ mit einem $P<0,001$ (Abbildung III.3)

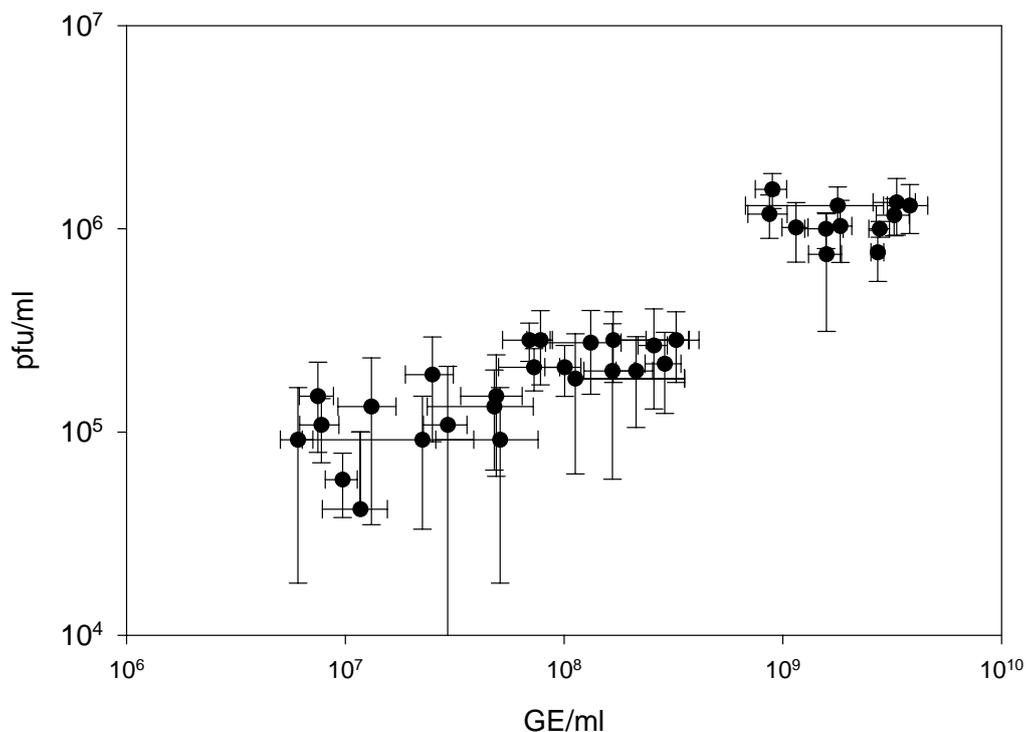


Abbildung III.3: Korrelation zwischen der Nukleinsäurekonzentration und der Anzahl der Plaques in YFV-enhaltenen Zellkulturüberständen ($n=36$). Die Ergebnisse der TaqMan-PCR wurden gegen die der Plaque-Assays aufgetragen. Die Pearson Analyse ergab eine Signifikanz von $P<0.001$ und eine Korrelation von $R=0.88$.

Die Abbildung III.3 zeigt auch, dass die Varianz des Plaque Assays in der Regel deutlich größer ist als die der TaqMan-PCR.

Aufgrund der bestehenden Korrelation erscheint die TaqMan-PCR eine geeignete Alternative zum Plaque-Assay zu sein. Dennoch wurde der Plaque Assay als unverzichtbare Methode eingesetzt, da hierdurch die Infektiosität des Virus erfasst wird.

III.1.1.5 Virusinaktivierung durch Gamma-Bestrahlung

Gammastrahlen sind in der Lage, biologische Strukturen durch primäre (Beschädigung des Genoms, Membranschäden) und sekundäre Effekte (Radikalbildung) zu zerstören. Viren verlieren dabei in Abhängigkeit von der eingesetzten Bestrahlungsdosis ihre Infektiosität. Infektiöse Proben, deren infektiöser Charakter für Versuche nicht benötigt wird, wurden in einem Experiment der Einfluss der Dosisabhängigen Inaktivierung auf die TaqMan-PCR untersucht. Daher wurde der Einfluss der zunehmenden Bestrahlung (0-80 kGy, Kobalt-60 (Co-60) als Strahlenquelle) auf YFV-haltige Proben bestimmt (Tabelle III.4). Die C_T -Werte sind mit dem NS3- und dem 3UTR-TaqMan-Assay für zwei verschiedene YFV-Konzentrationen bestimmt worden.

TABELLE III.4:
Gammabestrahlung zur Virusinaktivierung

kGy	C_T NS3	C_T 3UTR
0	28,75	35,79
5	31,74	36,27
10	30,07	34,91
15	29,43	33,20
20	29,70	35,62
25	30,12	36,19
30	30,48	35,97
35	30,31	35,86
40	24,44	32,17
45	30,87	-
50	30,62	36,24
55	30,40	36,06
60	31,81	38,23
65	32,06	36,86
70	31,91	36,38
75	32,02	36,18
80	30,88	35,78
Kontrolle	29,13	34,74
MW	30,33	35,73
STABW	1,80	1,39

kGy: kilo Gray, C_T : Schwellenwertzyklus

Die Doppelbestimmungen wurden hierbei gemittelt. Die Gamma-Bestrahlung nimmt trotz Beschädigungen des Genoms keinen negativen Einfluss auf die Nukleinsäuredetektion (Tabelle III.4), bei gleichzeitiger Zerstörung der Infektiosität des Virus. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass selbst in hochbestrahlten und nicht mehr infektiösen YFV-Proben ein TaqMan-PCR Nachweis ohne Beeinträchtigung durchgeführt werden kann. Somit lassen sich

sehr effektiv nicht infektiöse Standardpräparationen herstellen, die gefahrlos auch in normalen Diagnostiklaboratorien verwendet werden können.

III.1.2 Nachweis der Antigene

III.1.2.1 Westernblot

Beim Westernblot werden die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Bei diesem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen, so dass die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen können, nicht aber ihre Quartärstruktur. Die Proteine können dadurch von Antikörpern erkannt werden. Um die spezifische Bindung der Primärantikörper an die Epitope des YFV-Antigens nachzuweisen, wird ein art-spezifischer sekundärer Antikörper verwendet, der mit HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt ist. HRP kann verschiedene Substrate umsetzen, darunter Chlornaphtol, Minoethylcarbazol und Diaminobenzidin. Die Produkte bilden ein sichtbares Präzipitat um den Antigen-Antikörper-Komplex.

Weil die Renaturierung nicht vollständig ist, können bei Verwendung monoklonaler Antikörper, die mit einem Konformation spezifischen Epitop reagieren, Probleme auftreten. Die beiden MAKs (6330 und 6538) konnten nach SDS-PAGE nicht im Westernblot an das YFV-Antigen binden (Daten nicht gezeigt). Dieses Protein weist wahrscheinlich durch die SDS-Behandlung und das Aufkochen nicht mehr das Epitop in seiner nativen, antikörpererkennbaren Struktur auf.

III.1.2.2 Protein Dot-Blot

Als nächster Schritt wurde ein Dot-Blot Verfahren angewendet, um zu prüfen, ob die Antigenbindungsstellen durch die SDS-Behandlung zerstört werden würde. Dazu wurde das aus YFV-infizierten und YFV-nichtinfizierten Zellen isolierte Proteingemisch auf Nitrozellulosemembranen getropft. Zuvor wurde das isolierte Proteingemisch nativ, mit SDS behandelt, aufgeköcht oder mit SDS und aufgeköcht behandelt. Außerdem wurde das Proteingemisch einmal mit Protein G gekoppelten MAKs (6330 und 6538) mittels Immunpräzipitation vorgereinigt. In Abbildung III.4 sind die Ergebnisse der unterschiedlich behandelten Proben dargestellt.

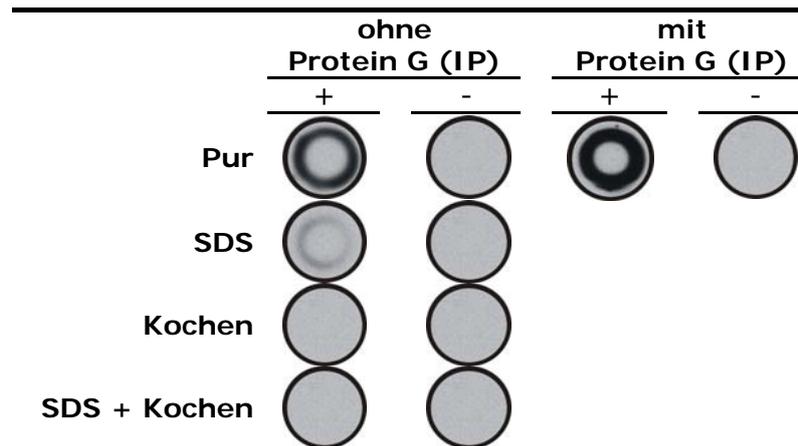


Abbildung III.4: Dotblot mit den MAKs 6330 und 6538. Die Proteingemische wurden jeweils verschieden behandelt, bevor sie auf Nitrozellulosemembranen aufgetropft und mit den jeweiligen Antikörpern (6330, 6538) detektiert wurden. Beide Antikörper detektieren das E-Protein. IP: Immunpräzipitation.

Man kann deutlich erkennen, dass SDS und vor allem die Temperaturbehandlung von 100 °C des Proteingemisches sich negativ auf die Antigen-Antikörpererkennung auswirkt. Im Westernblot konnten so nach erfolgter SDS-PAGE keine Signale erhalten werden. Nach Vorreinigung des Proteingemisches mit Protein G sollte nur noch das entsprechende Antigen (E-Protein) übrig sein, das dann mit dem MAK detektiert werden kann. Daher wurde der Westernblot in seinen Komponenten unterschiedlich verändert, so dass die denaturierende Wirkung gemindert wurde.

III.1.2.3 Natives Gel und modifizierter Westernblot

Das Proteingemisch kann ohne SDS-Behandlung und ohne Aufkochen gut mit dem MAK detektiert werden (Abbildung III.4). Um die spezifische Antikörper-Antigenreaktion dem E-Protein zuzuordnen wurde eine native PAGE durchgeführt. Dabei bleibt die Protein- bzw. Epitopkonformation erhalten. Die Reaktivität der Antikörper mit dem Protein war aber unter den beschriebenen Konditionen schlecht. Daher wurde der Westernblot ohne β -ME durchgeführt, so dass die Disulfidbrücken, die zur Proteinkonformation beitragen, erhalten blieben. Die SDS-Page wurde ohne β -ME im Auftragspuffer und ohne Aufkochen der Probe vor dem Auftrag auf das Gel durchgeführt. Unter diesen Bedingungen bleibt die Antigenität der Proteine für MAK 6330 und MAK 6330 erhalten (Abbildung III.5). MAK 6330 bindet sehr gut und ausschließlich an das E-Protein, während MAK 6538 das Protein (55 kDa) auch erkennen kann, aber ein weiteres Protein bei 38-40 kDa detektiert. Hierbei könnte es sich um ein

niedermolekulares Abbauprodukt des E-Proteins handeln. Das E-Protein, das als 55 kDa-Bande gut zu erkennen ist, konnte als das Protein identifiziert werden, dass von den Antikörpern gebunden wird. Die Negativkontrollen (nicht infizierte Zellen) zeigten kein Signal.

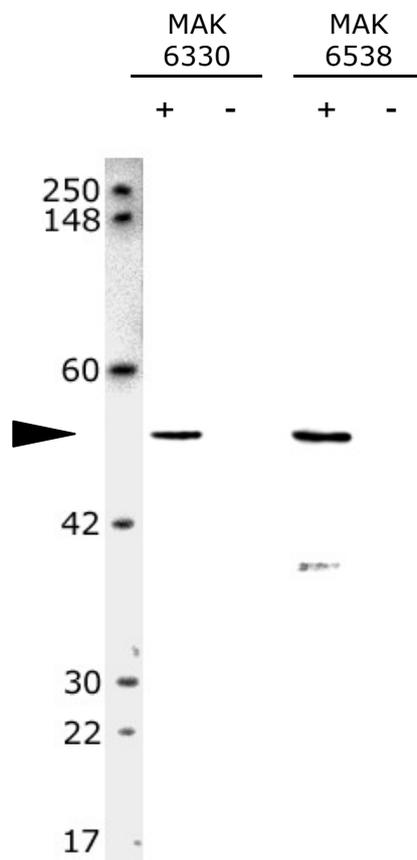


Abbildung III.5: Westernblot-Analyse (ohne β -Mercaptoethanol im Auftragspuffer) mit den Antikörpern MAK 6330 und 6538 zur Überprüfung ihrer Fähigkeit das E-Protein von YFV zu binden. Als Marker wurde MultiMark Multi-Colored Standard eingesetzt. +: infizierte Zellen, -: nicht infizierte Zellen.

III.1.2.4 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden vor jeder Infektion auf Mykoplasmen mittels PCR und IF getestet (Abbildung III.6). Das humane Serum Rep12 färbt die DNA im Kern wie auch in den Mitochondrien an. Mykoplasmen-negative Zellen zeigen neben der Kernfärbung noch feinverteilte angefärbte Mitochondrien im Zytoplasma. In Mykoplasmen-positive Zellen kann man zudem eine Anhäufung von größeren Fluoreszenzen entdecken, die zu den Mykoplasmen zugeordnet werden können, was durch eine positive PCR solcher Mykoplasmen infizierter Zellen bestätigt wird (Daten nicht gezeigt). Für alle Zellkultur-Versuche wurden nur Mykoplasmen-negativ getestete Zellen verwendet.

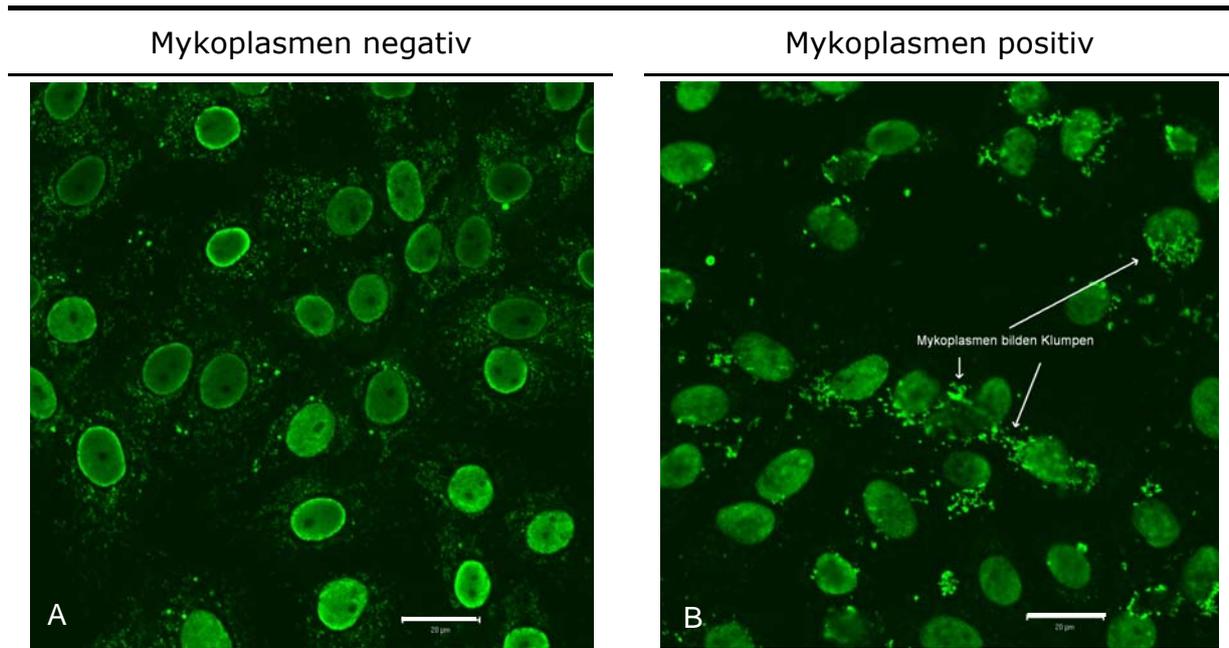


Abbildung III.6: Vero E6 Zellen, die auf Mykoplasmen mittels IF getestet wurden. A: Mykoplasmen-negative Zellen, 630fache Vergrößerung B: Mykoplasmen-positive Zellen, 630fache Vergrößerung. Zur Detektion der Mykoplasmen wurde das humane Serum Rep12 in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Sekundärantikörper: Goat-Anti-Mouse (FITC) 1:100.

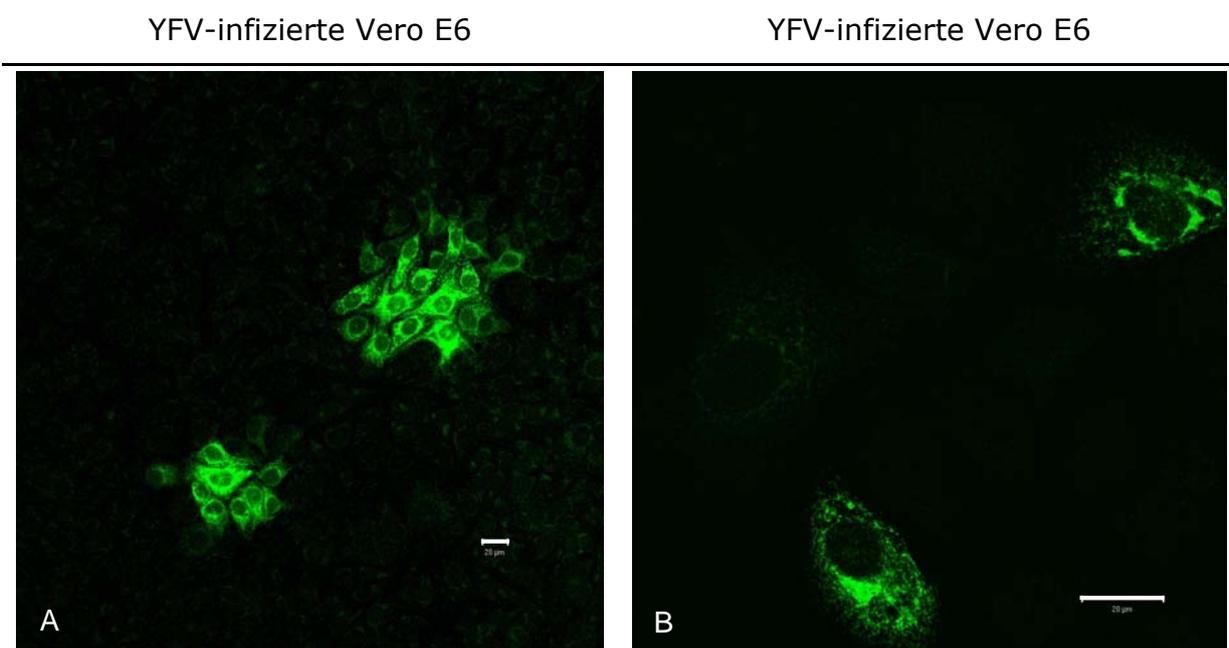


Abbildung III.7: YFV-infizierte Vero E6-Zellen. Vero E6-Zellen wurden mit YFV (Impf- und Wildtypstämme) infiziert (MOI=0,1) und mittels IF detektiert. A: Der MAK 6330 erkennt sowohl Wildtypviren (200fache Vergrößerung) als auch Impfstoffstämme (nicht gezeigt). B: MAK 6538 detektiert nur die YFV-Impfstämme (B: 630fache Vergrößerung). Der weiße Balken entspricht 20 µm.

MAK 6330 und MAK 6538 wurden als primäre Antikörper an diversen Zellen, die mit YFV infiziert wurden positiv getestet (Abbildung III.7). Der MAK 6330 erkennt sowohl Wildtypviren als auch Impfstoffstämme, während MAK 6538 nur die YFV-

Impfstämme detektiert. die deutliche Färbung des Zytoplasmas zeigt die Verteilung der Virusantigene in der Zelle. Das Virus ist zu keinem Zeitpunkt im Kern lokalisierbar. Eine Kreuzreaktivität mit anderen Flaviviren (FSME, DEN, JE) konnte in der Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Ergebnisse, die mit den MAKs 6330 und 6538 erzielt wurden, wurden diese als primäre Antikörper zur Detektion von YFV in allen späteren Experimenten zum Nachweis eingesetzt. Beide MAKs zeigen in der Immunfluoreszenz und im Westerblot eine spezifische Reaktion.

III.2 Erzeugung und Charakterisierung mutierter infektiöser Gelbfieber-Vollängenklone

III.2.1 Charakterisierung der *in vivo* Funktion des E-Proteins mittels monoklonaler Antikörper

Das glykosylierte E-Protein ist das größte Strukturprotein und stellt als Dimer die Hauptkomponente der Virusoberfläche dar. Das E-Protein steht im Verdacht für die Virulenz verantwortlich zu sein. Durch die vermutlich große biologische Bedeutung dieses Proteins fokussieren sich viele Untersuchungen auf dieses Protein [Galler et al., 1997].

In Kooperation mit Tuula Geske (Robert Koch-Institut Berlin) konnte in Neutralisationsexperimenten und passiven Protektionsversuchen (Schutzversuche) in Mäusen gezeigt werden, dass MAKs, die gegen das E-Protein gerichtet sind große Bedeutung auf die Virusinfektiosität haben.

In diesen Tests wurde die Spezifität der MAKs bezüglich den YFV-Wildstämmen (Asibi, Dakar) und den attenuierten 17D Impfstämmen (6330, 6360, 6513, 6527, 6601, 6538) näher untersucht. In Tabelle III.5 sind die mit Hilfe des Neutralisationstestes und der Schutzversuche ermittelten Daten zusammengefasst.

TABELLE III.5:
Reaktivität der anti-E-Protein Antikörper mit YFV. Neutralisationstest und passive Protektionversuche in Mäusen

MAK	Neutralisation [%] *			Passive Protektionsversuche in Mäusen [%] **					
	17D	Asibi	Dakar	10 mg / Maus	1 mg / Maus	0,1 mg / Maus	10 mg / Maus	1 mg / Maus	0,1 mg / Maus
				17D			Dakar		
6330	81,2	100	82	100	100	87,5	100	37,5	0
6360	56	96	43	100	100	87,5	62,5	62,5	12,5
6513	41,4	98	0	100	100	75	87,5	100	100
6527	72,6	45	29	100	75	87,5	100	25	0
6601	46,4	86	0	100	100	100	37,5	75	0
6538	100	0	100	100	100	100	100	100	100

*Angegeben ist die Neutralisationskapazität von 100 µg MAK für 100 PFU in Prozent. 17D steht für mehrere Impfstoffchargen, die alle nahezu gleich reagierten und daher hier gemittelt dargestellt werden. ** Angegeben sind die überlebenden Tiere (n=8) in Prozent nach Infektion. MAK wurden den Mäusen i.V. 24 h vor der Virusinjektion gegeben.

Keiner der untersuchten MAKs neutralisiert sowohl alle YFV-Impfstämme, als auch alle YFV-Wildtypstämme gleichermaßen gut. Der MAK 6538 kann alle Gelbfieberimpfstämme zu 100 % im Neutralisationstest und in den Schutzversuchen neutralisieren, selbst in niedrigen Konzentrationen. Dagegen kann er nicht alle Wildtypstämme gleichermaßen gut neutralisieren (0-100 %). Der Wildtypstamm Asibi kann zwar nicht vom MAK 6538 neutralisiert werden, jedoch kann er vom MAK 6330 sehr gut neutralisiert werden. Alle anderen MAKs zeigen bei gleicher AK-Konzentration eine geringere Neutralisation.

Auch in den Schutzversuchen konnte gezeigt werden, dass MAK 6538 die Impfstämme selbst bei geringerer AK-Konzentration effizient neutralisiert. Alle anderen Antikörper schützten auch die Mäuse bei der höchsten Dosierung von 10 mg vor YFV-17D. Drei MAKs (6601, 6602 und 6538) boten noch bei 0,1 mg Dosis eine gute Protektion. Zwei MAKs (6538 und 6513) konnten vor dem neurotrophen Dakar Virus bei dieser Dosis schützen. Der Schutz gegenüber dem neurotrophen Dakar Stamm konnte bei einigen MAKs nur mit der hohen 10 mg Dosis erreicht werden.

Die neutralisierende Aktivität der MAKs 6538 und 6330 wurden weiterhin in Zellkulturen gegenüber weiteren YFV-Virusstämmen in Abhängigkeit von verschiedenen MAK-Konzentrationen getestet (Tabelle III.6). Der MAK 6538 zeigte selbst noch in geringen Konzentrationen eine gute neutralisierende Wirkung für die Impfstoffstämme. Dagegen konnte keine neutralisierende Wirkung bei dem Wildtyp Asibi festgestellt werden.

TABELLE III.6:

Neutralisierende Aktivität [%] von MAK 6538 und 6330 bei Impfstämmen (17D, Arilvax, Stamaril, Brasil) und einem Wildtypstamm (Asibi)

	MAK 6538 [mg/mL]						MAK 6330 [mg/mL]					
	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19	142,5	71,3	35,6	17,8	8,9	4,5
17D	100	100	100	100	98,8	89,8	92,8	83,2	70,2	51,7	47,7	40,3
Arilvax	100	100	100	99,7	92,6	-		99	95	89	75	52
Stamaril	100	100	100	99,3	80,6	-						
Brasil	100	100	100	96,2	89,5	73,9						
Asibi (Wildtyp)	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	92

Anders als der MAK 6538 zeigte der MAK 6330 eine sehr gute neutralisierende Fähigkeit (Tabelle III.6). Jedoch nicht in der gleichen geringen Konzentration wie der MAK 6538. Daher wurde dieser MAK in den folgenden Arbeiten weniger verdünnt eingesetzt.

Da kein MAK attenuierte wie Wildtypviren gleichermaßen gut neutralisieren kann, wurden alle folgenden Arbeiten mit den beiden MAKs 6538 und 6330 durchgeführt, da sie zusammen sowohl Impfstoffstämme als auch die Wildtypstämme am besten erkennen.

III.2.2. Charakterisierung der Gelbfieber-Vollängenklone YFV-pACNR/FLYF-17DpMutE52, -pMutE200 und -pMutE299

Durch die Neutralisationstest und Schutzversuche mit Antikörpern, die gegen das E-Protein gerichtet waren wurde der Verdacht verstärkt, dass das E-Protein für den Tropismus und für den Virus-Eintritt in die Zelle verantwortlich gemacht wird. Der Vergleich der Stämme Asibi und 17D zeigt 48 Nukleotidaustausche auf [Dos Santos et al., 1995], die zu 20 Aminosäureaustausche führen, die über das ganze Genom verteilt sind. Dabei sind acht Aminosäuren, die im Bereich des E-Proteins lokalisiert sind besonders interessant [Galler et al., 1997].

Drei von den acht Aminosäuren des E-Proteins wurden für anschließende Mutationsstudien verändert um einen Aufschluss über die molekularen Determinanten der Attenuierung zu bekommen.

Ausgehend vom Vollängenklon YFV-pACNR/FLYF-17D, der die gesamte genetische Information des YFV-17D als cDNA-Insertion im Vektor pACNR (unter einem SP6-Promotor) enthält, wurden durch gerichtete Mutagenese mutierte Vollängenklone hergestellt. Von diesen sollte *in vitro* eine RNA transkribiert werden, die nach Transfektion in Zellen die Bildung neuer Viren initiieren sollte.

Die Codons für die Aminosäuren E-52, E-200 und E-299 vom YFV-pACNR/FLYF-17D-Klon wurden einzeln jeweils so verändert, dass sie statt der 17D-spezifischen Aminosäure, die Aminosäure vom Wildtyp YFV-Asibi an der entsprechenden Stelle tragen (Tabelle III.7). Inwieweit diese Austausch, das Virus hinsichtlich seiner Replikationsfähigkeit und Pathogenität verändern, soll in diesem Teil der Arbeit untersucht werden.

TABELLE III.7:
Positionen der Aminosäureunterschiede zwischen YFV-17D und YFV-Asibi.

Protein	Aminosäure [Nr.]	Stamm 17D	Stamm Asibi	Mutation
M	36	Phe	Leu	
E	52	Arg	Gly	pMutE52 (AGA-GGA)
	170	Val	Ala	
	173	Ile	Thr	
	200	Thr	Lys	pMutE200 (ACA-AAA)
	299	Ile	Met	pMutE299 (ATA-ATG)
	305	Phe	Ser	
	380	Arg	Thr	
	407	Val	Ala	
NS1	307	Val	Ile	
NS2A	61	Val	Met	
	110	Ala	Thr	
	115	Ala	Thr	
	126	Phe	Ser	
NS2B	109	Leu	Ile	
NS3	485	Asn	Asp	
NS4A	146	Ala	Val	
NS4B	95	Met	Ile	
NS5	836	Lys	Glu	
	900	Leu	Pro	
3' NCR		C	U	
		C	U	
		A	G	
		C	A	

Ausgehend vom Vollängenklon wurden die Aminosäuren an der Position E52, E200 und E299 ausgetauscht.

Über mehrere Klonierungsschritte wurde ausgehend vom Vollängenklon YFV-pACNR/FLYF-17D die Einzelmutationen in dem Gen für das E-Protein mittels direkter Mutagenese eingeführt. Dazu wurde zunächst der E-Genabschnitt in zwei Teilen in kleinere „high copy“ Vektoren (pRS1, pProEX) kloniert. Hierfür wurde der E-Genabschnitt wie auch die kleinen „high copy“ Vektoren mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten (Abbildung III.8), die Vektoren anschließend dephosphoryliert und die Fragmente auf ein Gel aufgetragen. Die gewünschten Fragmente wurden aus dem Gel eluiert, der E-Genabschnitt wurde mit pRS1 bzw. pProEX ligiert und in *E. coli* MC1061 transformiert. Die den E-Genabschnitt enthaltenen Vektoren wurden mittels Ampizillinresistenz ausgewählt und mit Restriktionsanalysen überprüft.

Bei den so getesteten Klonen wurde mit den jeweils geeigneten *mismatch*-Primern durch die Methode QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) jeweils ein Basenaustausch eingeführt. (Abbildung III.9). Die Mutagenese wurde mittels Sequenzanalysen überprüft.

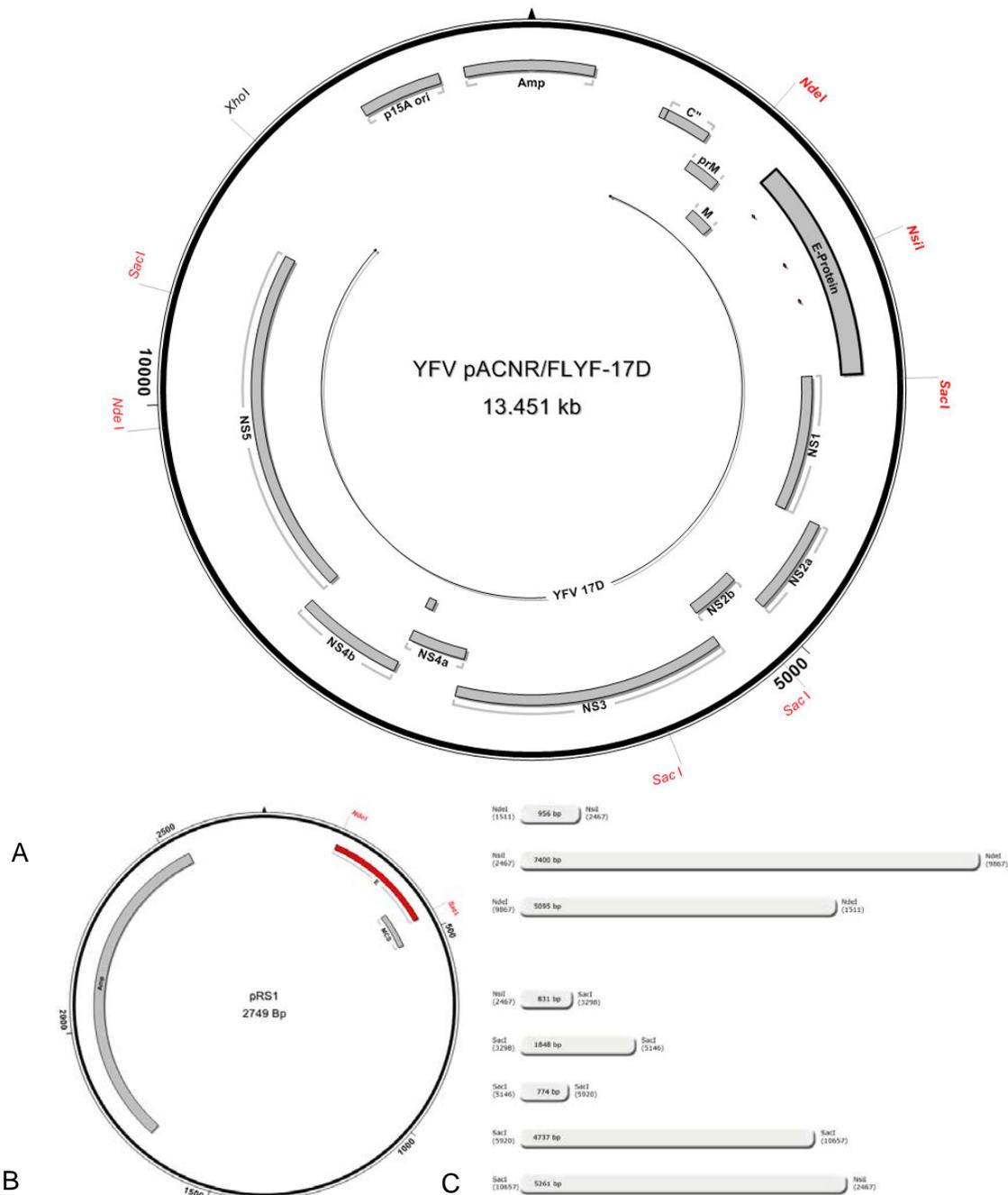


Abbildung III.8: Schema des YF-Gesamtklons (A) und eines der benutzten Vektoren pRS1 (B). In rot dargestellt sind die Restriktionsenzyme, mit denen das Gen für das E-Protein in zwei Teile geschnitten und jeweils in dem Vektor pRS1 subkloniert wurde. Die Fragmente, die dabei kloniert wurden, sind unter (C) aufgeführt. Für die Mutagenese wurden die Fragmente NdeI-SacI, NdeI-NsiI und NsiI-SacI verwendet.

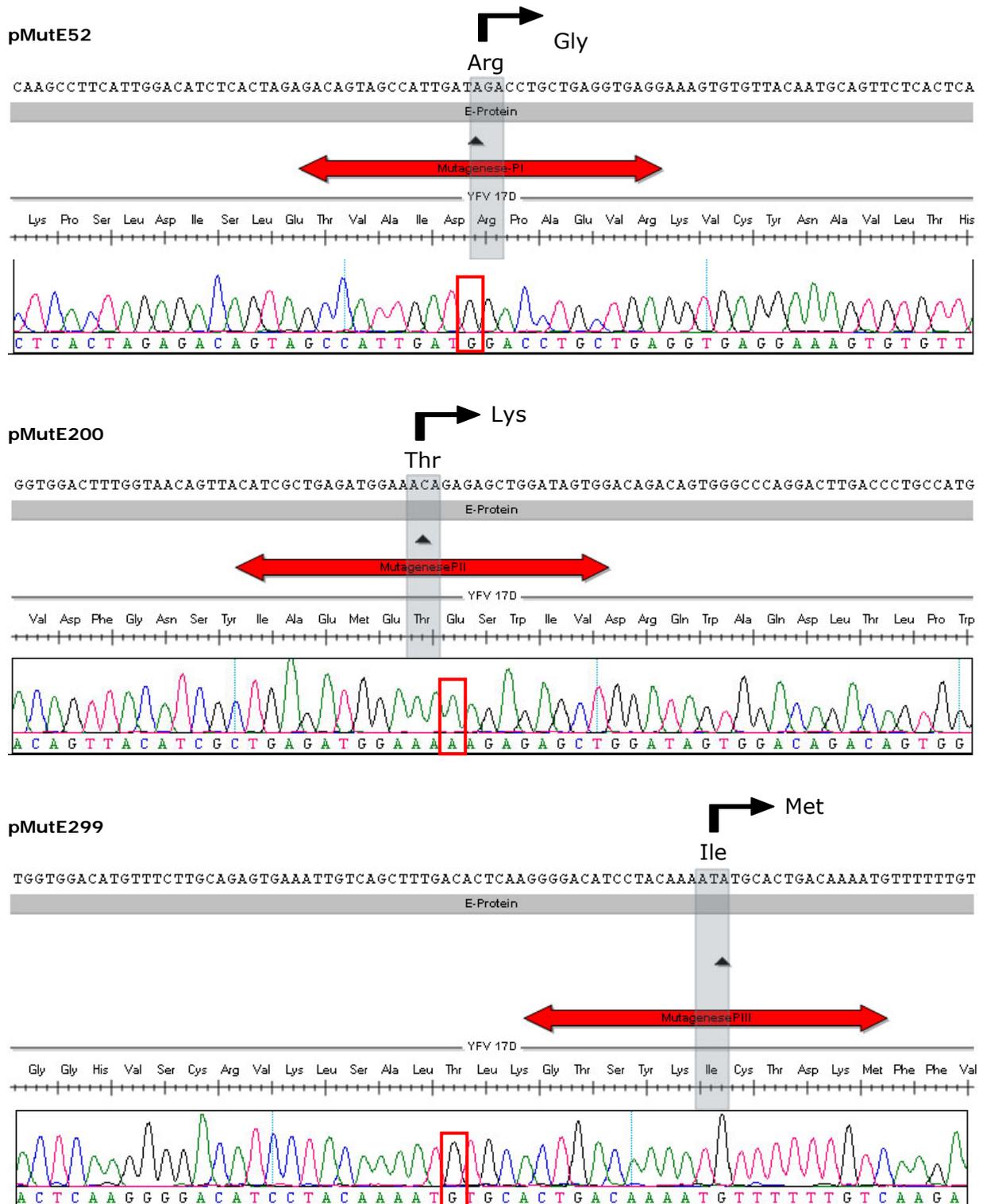


Abbildung III.9: Ausgangssequenz und Mutagenese-Primer für die Stellen pMutE52, pMutE200 und pMutE299 des Gens für das E-Protein. Das veränderte Nukleotid, das zum Aminosäureaustausch führt, ist jeweils durch ein schwarzes Dreieck gekennzeichnet. Dabei ist pMutE52 von Arg zu Gly, pMutE200 von Thr zu Lys und pMutE299 von Ile zu Met verändert worden. Unter den Ausgangssequenzen befinden sich jeweils die Chromatogramme der Sequenzierung nach erfolgter Mutagenese und Rückklonierung in den Vollängenklon YFY-pACNR/FLYF-17D. Die roten Umrandungen zeigen das jeweils veränderte Nukleotid.

Nach der Mutagenese wurde der veränderte E-Genabschnitt in den Vollängenklon YFV-pACNR/FLYF-17D zurückgeführt. Dazu wurde das Fragment durch Restriktionsenzyme aus dem kleinen Vektor herausgeschnitten und in den Vollängenklon pACNR/FLYF-17D ligiert. Anschließend wurde der Erfolg der Rückklonierung in den Vollängenklon durch Sequenzierung überprüft (Abbildung III.9).

Die so entstandenen mutierten Vollängenklone sind pACNR/FLYF-17D-MutE52 (pMutE52), pACNR/FLYF-17D-MutE200 (pMutE200) und YFV-pACNR/FLYF-17D-MutE299 (pMutE299) (Abbildung III.9).

Nach erfolgreicher Einführung der Mutation konnte durch eine *in vitro* Transkription infektiöse RNA gewonnen werden, die für die Transfektion in die verschiedenen Zelllinien verwendet wurde.

III.2.3 Transfektion verschiedener Zelllinien

Effizienz der Transfektion hängt sehr stark von der Zelllinie ab, sowie vom Transfektionsreagenz. Bevor die Zellen mit den mutierten Vollängenklonen transfiziert wurden, wurden chemische Transfektionsreagenzien hinsichtlich ihrer Effizienz mit dem unveränderten Vollängenklon untersucht. Es wurden vier verschiedene Zelllinien für die Transfektion ausgesucht, die jeweils die Organismen Affe, Insekt, Hamster und Mensch repräsentieren. Die besten Ergebnisse konnten mit der Elektroporation, die im Bernhard-Nocht Institut (Hamburg) durchgeführt wurden, erzielt werden. Da dieses Gerät jedoch in dem S3-Labor des Robert Koch-Institutes nicht vorhanden war, mussten chemische Transfektionsmethoden eingesetzt werden (Tabelle III.8).

TABELLE III.8:

Transfektionseffizienz diverser Transfektionsreagenzien in verschiedenen Zelllinien

	<u>Effectene</u>	<u>SuperFect</u>	<u>Lipofectamine 2000</u>	<u>Elektroporation*</u>
Vero E6	++	+	+++	++++
C6/36	+	-	++	n.d.
BHK-21	++	+	+	++++
293T	++	++	+++	+++

Transfektion von YFV aus dem Vollängenklon pACNR/FLYF-17D in Vero E6, C6/36, BHK-21 und 293T-Zellen. Die Transfektionen wurden in Dreifachansätzen an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt. Die hier zusammengefassten Ergebnisse spiegeln den Durchschnitt wider. +++++: >50 %, ++++: bis 30 %, ++: bis 20 %, +: bis 10 %, -: <10 % Transfektionseffizienz. *: Die Elektroporation mit YFV aus dem Vollängenklon pACNR/FLYF-17D wurden am Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg) durchgeführt.

Hierbei kamen Lipofectamine 2000, Effectene und Superfect zur Anwendung und wurden bezüglich der Transfektionseffizienz miteinander verglichen. Die Transfektionseffizienzen wurden anhand der Immunfluoreszenzanalyse optisch bewertet. Die Effizienz schwankte für die verschiedenen Zellen, wobei mit Lipofectamine 2000 die größten Effizienzen erhalten wurden. Daher wurden alle anschließenden Arbeiten mit diesem Transfektionsreagenz durchgeführt.

Die infektiöse RNA, erhalten aus den veränderten Vollängenklonen pMutE52, pMutE200 und pMutE299 wurde in verschiedene Zellen transfiziert. Als Kontrollen wurden die Zellen mit infektiöser RNA, erhalten aus dem Plasmid YFV-pACR/FLYF-17D transfiziert und mit dem Wildtypvirus YFV-Asibi infiziert.

In Tabelle III.9 sind die Transfektionseffizienzen der Klone, mit denen die verschiedenen Zellen transfiziert wurden aufgelistet. Die durchschnittliche Transfektionseffizienz wurde hierbei mittels Immunfluoreszenzmarkierung mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Am besten lassen sich beide Vero-Zelllinien und die Insektzelllinien transfizieren. Dies spiegelt sich auch in Abbildung III.12 wider, wo der virushaltige Überstand der transfizierten Zellen in einer weiteren Passage kultiviert wurde.

TABELLE III.9:
Transfektionseffizienz der Vollängenklone in diverse Zelllinien

Zelle	pYFV17D	pMutE52	pMutE200
293T	++	+	++
AP61	++	++	++
BHK21	++	++	++
C6/36	+++	+++	++
Hek293	+	+	+
Hep2	+	+	-
HuH7	+	+	+
STC-1	+	-	-
SW13	+	+	+
U-937	-	-	-
Vero B4	+++	++	++
Vero E6	+++	+++	++

Die Transfektionen wurden in Dreifachansätzen an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt. Die hier zusammengefassten Ergebnisse spiegeln den Durchschnitt wider. +++: bis 30 %, ++: bis 20 %, +: bis 10 %, -: <10 %.

Das mutierte Vollängenklon pMutE299 zeigte bei allen Zellen eine Transfektionseffizienz von 0 %. Es war nicht möglich, Virusproteine von pMutE299 in den Zellen zu detektieren, was sich auch im Plaque-Assay und in der TaqMan-PCR bestätigen ließ. Die Infektion mit YFV-Asibi wird in der

Tabelle III.9 nicht weiter berücksichtigt, da die Infektionseffizienz nicht mit der Transfektionseffizienz vergleichbar ist. Die Infektionen mit YFV-Asibi erreichten hier nach 4-6 Tagen 80-100 %.

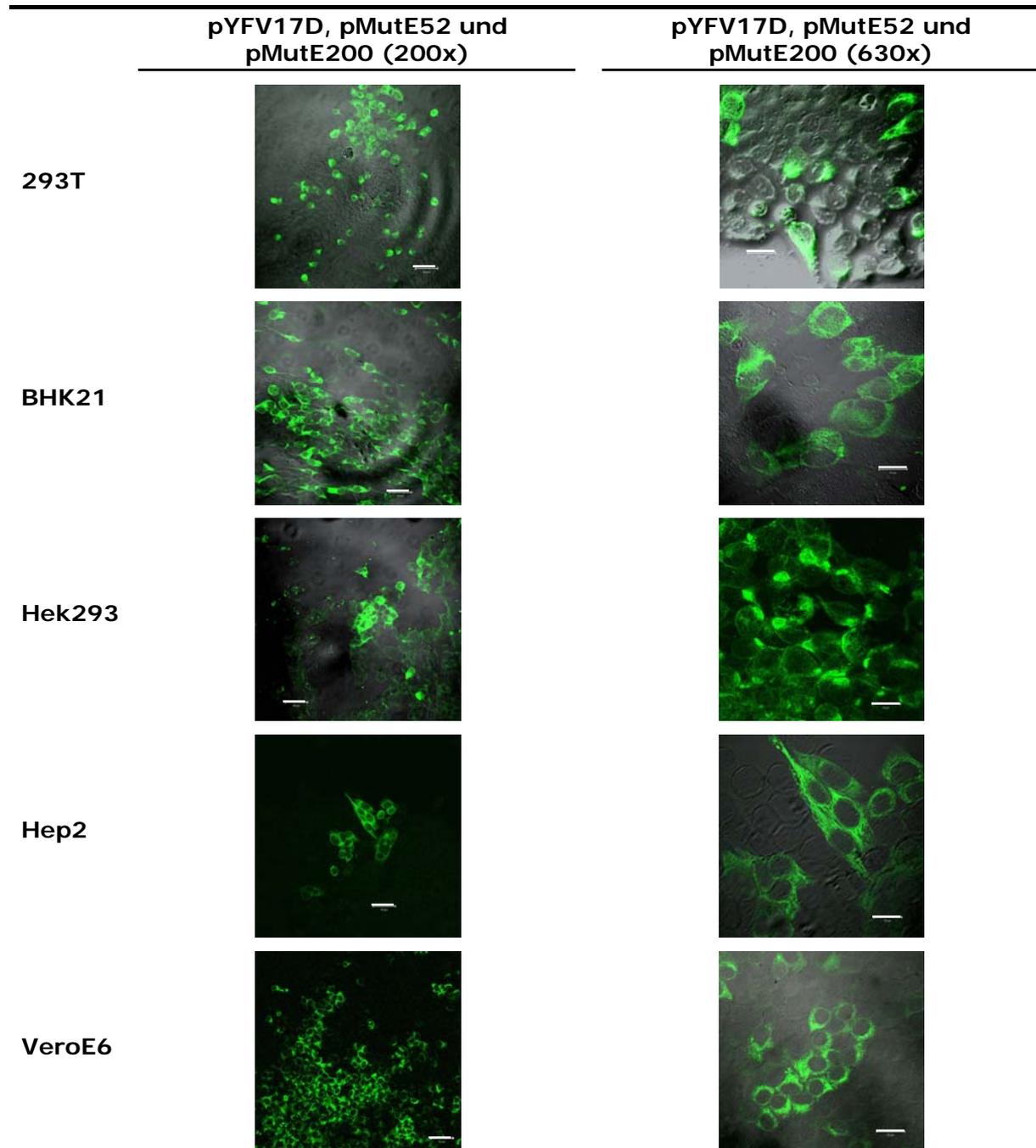


Abbildung III.10: Immunfluoreszenz verschiedener Zelllinien drei Tage nach Transfektion. Konstrukte: YFV-pACNR/FLYF-17D, YFV-pACNR/FLYF-17DMutE52 und YFV-pACNR/FLYF-17DMutE200. Da zwischen diesen Konstrukten keine Unterschiede in der IF erkennbar waren, wurde der Einfachheit halber nur jeweils ein Bild in zwei Vergrößerungen (200x, 630x) ausgewählt. Weißer Balken links: 50 μ m, weißer Balken rechts: 20 μ m. Repräsentativ sind hier die Zelllinien 293T, BHK21, Hek293, Hep2 und VeroE6 gezeigt.

Die Transfizierbarkeit und die Auslösung der Virusproteinbiosynthese wurde auch unter anderem mittels IF sichtbar gemacht (Abbildung III.10).

Beide eingesetzten MAKs (6538, 6330) detektierten YFV-E-Protein in transfizierten Zellen, wohingegen nichttransfizierte Zellen keine viralen Proteine produzierten. In der Immunfluoreszenz konnten keine qualitativen Unterschiede bezüglich der infizierten Zellen zwischen den verschiedenen Klonen erkannt werden. Abbildung III.10 zeigt einige repräsentative Bilder der mit YFV-pACNR/FLYF-17D, pMutE52 und pMutE200 transfizierten Zellen.

Mit Hilfe der IF konnte gezeigt werden, dass sich Virusantigene in der Zelle nach der Transfektion nachweisen ließen. Inwieweit es auch zur Produktion von infektiösen Partikeln kommt, die aus den Zellen geschleust werden, wurde durch den Plaque-Assay weiter untersucht (Abbildung III.11).

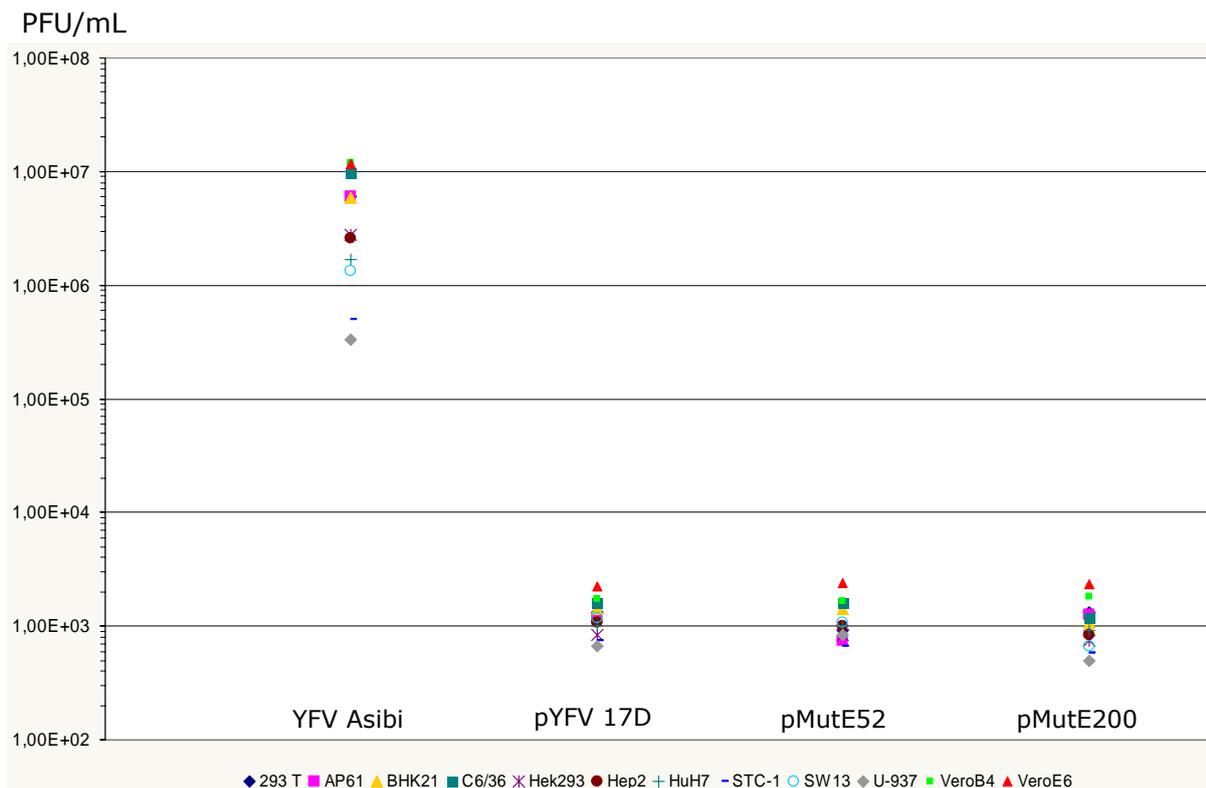


Abbildung III.11: Virustiter in PFU/mL aus den Überständen von transfizierten bzw. infizierten Zelllinien. Dabei wurden die Zellen mit YFV-pACNR/FLYF-17D (pYFV17D), YFV-pACNR/FLYF-17DMutE52 (pMutE52), YFV-pACNR/FLYF-17DMutE200 (pMutE200), YFV-pACNR/FLYF-17DMutE299 (pMutE299) und YFV-Asibi transfiziert bzw. letzteres infiziert. Die Überstände wurden drei Tagen nach Transfektion entnommen und die infektiösen Einheiten in PFU/mL mit dem Plaque-Assay bestimmt. pMutE299 ist nicht in der Grafik berücksichtigt, da die Überstände keine infektiösen Partikel enthielten.

Die mit YFV-Asibi infizierten Zellen erzielten einen weitaus höheren Virustiter als die transfizierten Zellen. Je nach Zelllinie ergaben sich Virustiter zwischen

$3,3 \times 10^5$ und $1,2 \times 10^7$, wobei die Affennierenzellen und die Insektenzellen die höchsten Titer zeigten. Die transfizierten Zelllinien hatten einen Virustiter zwischen 5×10^2 und $2,4 \times 10^3$. Auch hier war der Titer in den Affennierenzellen am höchsten, aber auch die Insektenzellen ließen sich gut transfizieren. Alle anderen Zellen ordneten sich in der Mitte bezüglich der Transfektion und der Virusvermehrung an. Zwischen dem YFV-pACNR/FLYF-17D und den beiden veränderten Vollängenklonen (pMutE52, pMutE200) konnten keine Unterschiede festgestellt werden. pMutE299 war nicht zu replizieren.

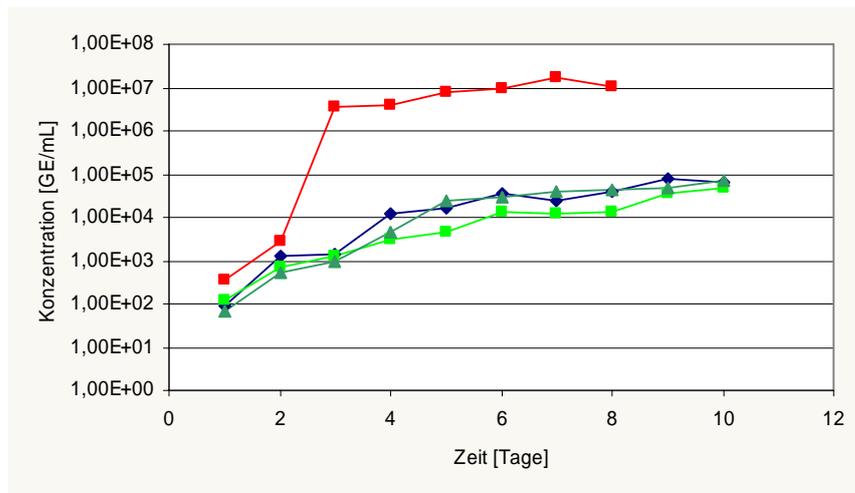
III.2.4 Infektionsstudien mit den erzeugten Gelbfiebervollängenklonen in Zellkultur mittels Reinfektion

Um die Replikationskompetenz der aus den Konstrukten erhaltenen Viren zu testen, wurden verschiedene Zellen mit Viruspartikeln, die aus dem Überstand von den transfizierten Zellen erhalten wurden reinfiziert. Inwieweit diese nach der Transfektion freigesetzten Viruspartikel weiterhin replizieren, wurde mittels der TaqMan-PCR im Laufe des Infektionsverlaufes bis zu zehn Tagen detektiert. So konnte neu gebildete virale RNA wie Abbildung III.12 zeigt detektiert werden. Für alle Virusvollängenklonkonstrukte außer pMutE299 wurde mit dem Plaque-Assay überprüft, ob infektiöse Partikel gebildet wurden. Die Titer, die mit dem Plaque-Assay bestimmt wurden zeigen, dass die PFU um den Faktor 1000-5000 unter den ermittelten Werten der TaqMan-PCR (GE/mL) liegen.

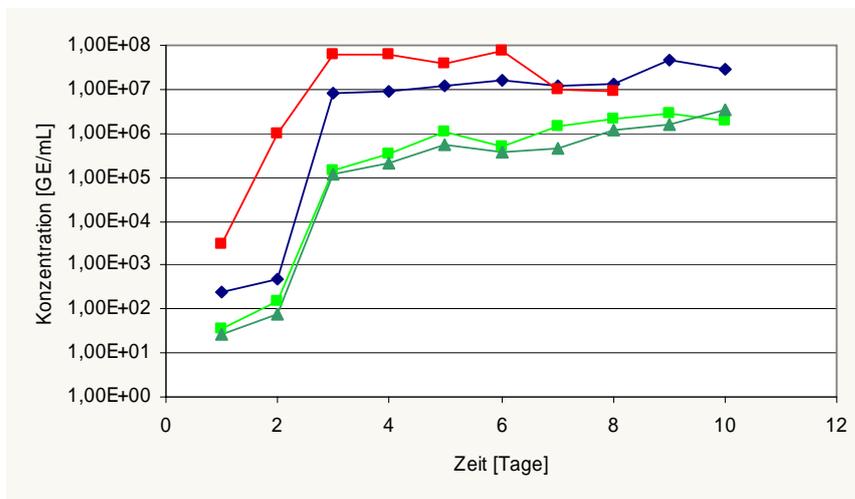
Bei fast allen Zelllinien, hier durch Hek293 und VeroB4 repräsentiert, liegen die Titer von YFV-pACNR/FLYF-17D, sowie von den mutierten Klonen pMutE52 und pMutE200 weit niedriger als bei einer Infektion mit Asibi (Abbildung III.12). Zwischen den Titern der zweiinfektiösen Klone und dem Impfvirusklon ist kein relevanter Unterschied erkennbar. Nur die Zelllinien Vero B4 und Vero E6, die mit YFV-pACNR/FLYF-17D transfiziert wurden, produzieren etwa zehnmal mehr RNA im Vergleich zu den beiden mutierten Klonen (pMutE52 und pMutE200).

TaqMan-PCR nach Reinfektion mit dem Überstand transfizierter Zellen

Hek293



VeroB4



U-937

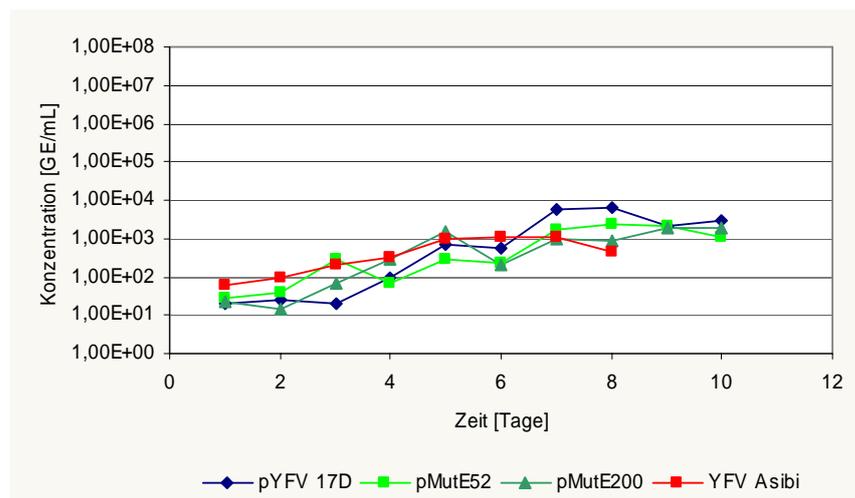


Abbildung III.12: Virustiter in GE/mL nach der Reinfektion mit den Überständen von transfizierten Zelllinien. Dabei wurden die Zellen mit YFV-pACNR/FLYF-17D (pYFV17D), YFV-pACNR/FLYF-17DMutE52 (pMutE52), YFV-pACNR/FLYF-17DMutE200 (pMutE200) transfiziert. YFV-Asibi wurde als Vergleich mitgeführt. Repräsentativ sind hier die Zelllinien Hek293, VeroB4 und U-937 gezeigt.

III.3 Analyse und Vergleich von importierten Gelbfieber-virusstämmen afrikanischer Herkunft

III.3.1 Design eines Primersets zur vollständigen Sequenzierung diverser Gelbfieberstämmen

Afrikanische Wildtyp-Gelbfiebervirusisolate, sowie auch isolierte Gelbfieberviren aus Impfwischenfällen sollten sequenziert und anschließend charakterisiert werden. Dazu wurden Primer für das gesamte Gelbfiebergemom konzipiert. Die ersten Primer sind anhand der Sequenz von YFV-17D entwickelt worden und nachdem die ersten Amplifikate mit diesen erfolgreich erhalten wurden, wurden neue Primer an dieser neu erhaltenen Sequenz erstellt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle III.10 zusammengefasst. Die Primer liegen in Sequenzbereichen mit hoher Homologie zwischen allen bisher bekannten YFV-Stämmen und ergeben überlappende Teilfragmente des Gesamtgenoms, so dass mit dem Primer-Satz bei einmaliger Amplifikation das Virusgenom dreimal sequenziert wird. Das 5´- und das 3´-Ende des Virusgenoms sind jeweils in Topo TA kloniert worden und nachfolgend mit dem BGH und T7-Primer amplifiziert und sequenziert worden. Für eine Diagnostik können die Primer-Paare auch direkt zur Sequenzierung verwendet werden. Die Sequenzlänge beider Stämme (IvoryC1999, Gambia2001) betrug 10862 Nukleotide. Die Sequenzen sind in der GenBank unter der Nummer AY603338 (IvoryC1999) und AY572535 (Gambia2001) zu finden.

TABELLE III.10:
Region, Sequenz und Position der Oligonukleotide, die für zur Sequenzierung der verschiedenen Gelbfieberstämmen genutzt wurden.

	Primer	Sequenz (5'→3')	5'	3'
5´NTR	U1 s	AGT AAA TCC TGT GTG CTA ATT GAG GT	1	26
	U1b as	TGT TTG ACA AGG AGC GAA CTC CT	172	194
C	U1c s	ATG CTG GAC CCA AGA CAA GGC T	329	350
	U1d s	AGA GAG TGG TGG CCA GTT TGA T	372	393
prM	U2 s	AAC GTT AGA GTC GCA TAT GGT AAG T	689	713
M	U1 as	TTT CTT GCC GGG TCT TCA AAC CAT	777	800
E	164 s	GCC AAA TTC ACT TGT GTC AAA TTC AT	1322	1347
	U2 as	CTG ATA GTG CAT CAA ACT TGA GAG T	1445	1469
	U3 s	CCT GCC ATG GCA GAG TGG AAG T	1615	1636
	E1 s	TGG CAC AAA GAG GGG AGT TCA ATA GGA	2138	2164
	U4 s	CTC CGC TGG AGG GTT CTT CAC T	2236	2257
	U4b s	CTC CGC TGG AGG GTY CTT CAC T	2236	2257
	164 as	CCA ACC GAA GTG AAG AAC CCT CCA	2242	2265
	U3 as	TGT TAT CCA GTT CAA GCC GCC AAA T	2308	2332

	U4c s	ATT TGG CGG CTT GAA CTG GAT AAC A	2308	2332
	E2 s	ATG AGA TGT GGA GAA GCA GGG CAG AT	2646	2671
	E2 as	ATC TGC CCT GCT TCT CCA CAT CTC AT	2646	2671
	U2b as	CCC GTC CCA AAC TCC TCT ATC T	2913	2934
	76 s	GGA GGC CCA GTT AGC TCT CAC AAT CAT A	3194	3221
	U4c as	CCT CAC TTC TAG TGG TAC CTG CAT	3257	3278
NS1	E1 as	GGA CAC GCT TCT CTC CTC ACT TCT A	3270	3288
	U4 as	CTG GAC ACG CTT CTC TCC TCA CT	3274	3296
	U4b as	CCC GCT ATC CGT GGT GGA TC	3348	3367
	76b as	ACC ACT TCC ATT GCT ATC ATC ATG C	3543	3567
	3597 s	ATG CTG GTT GGA GGA GTG GTG CT	3596	3618
	3666 as	TCA GCA AAT CAA GGA GAG TTA CCT G	3644	3665
	U5 s	GCT GAG GTG AGA CTT GCC GCA AT	3989	4011
NS2a	76 as	AGT GTG AGG GCC ACC AGA GGT ATA GTC TT	4076	4104
	119 s	TGC ATT TCT GGC AAC CCG CAT	4147	4167
NS2b	U5 as	GAA AGC CAG TCC TGC CAG CAC T	4225	4245
	FJb s	AGG TTC AGT TGA TTG CTG CTG T	4857	4878
	U6 s	CTA CCC GAG TGG CAC TTC AGG AT	4966	4988
	119 as	GAC ACG AAG GAG TTG TCA CCG ACA A	5043	5067
	5375 as	TAA GTT AGG GTG GCA TGG CAC AT	5363	5385
	98 s	TGG ATC CAG CTA GCA TAG CCG CT	5451	5473
NS3	U6 as	CTG GGT ATG TCC GTT TGAACA TCT	5583	5607
	U3b s	ACG GCA TGG TTC CTT CCA TCC AT	5657	5679
	U7 s	GAC CAG CCG GTA TGG CTT TCG T	6203	6224
	98 as	CTT GGG CGC AGA GGC TTC TTT G	6345	6366
	100 s	AAA GAA GCC TCT GCG CCC AAG G	6346	6367
	U7 as	CCT CCT ACC TTC AGC AAA CTT GAT	6419	6439
	U8 s	CTT ACC GCA ATG CAC TAT CAA TGA T	6555	6579
	U9b s	GAA TAG CCC AGT CAG CCT CAG T	7092	7113
NS4a	U9 s	CAT AAT GCT GCT GGT CAG TGG CT	7165	7187
	100 as	GGT AAA ATG AGA GAC CAG TGG AGC ATG GC	7232	7260
	U8 as	GTA AAA TGA GAG ACC AGT GGA GCA T	7235	7259
NS4b	U9c s	TGG CTG AAG GCA TTG TCC TAG CAT	7464	7487
	U9b as	AGA TTC AGT TCC CTC TTC CAG ACT	7666	7689
	U10 s	TTT ACT CTT GGA AGA GAC GGC CAT	7943	7966
	U9 as	GTT TTG TCC TTG AAG GTG ATG ATG T	8001	8025
	U9c as	TGT GAC GCA TGA CGA TGA TGA CT	8082	8104
	150 s	CCC GCA GCA ATG TCA CAT TTA CTG T	8310	8334
NS5	U10 as	GGT CCC TTG TCT GTC TCA ACA CT	8429	8451
	U11 s	GTG TCG GAC TTG TGT GTA CAA CAT GAT	8977	9003
	150 as	CAT CCG CGT AGA ATC CAC CAC C	9218	9239
	176 s	ATT GTG GTG CCT TGC CGA GAA CA	9818	9840
	U11 as	CAC ATG TTG GCA TAG GCC TTG CT	9911	9933
	U12 s	XAC CAA CAA CCC ACA CAT GCA GGA	10102	10125
	U12b s	CTC CAC ACA TTG AGA CAG AAG AAG T	10511	10535
3' NTR	176 as	CCT GGC GTC AAT ATG GTC CCA CT	10743	10765
	U12 as	GGT TTT GTG TTT GTC ATC CAA AGG T	10835	10859

Abkürzungen: s: sense, as: antisense, NTR: Nicht-translatierte Region, NS: Nicht-Strukturprotein. Aufgelistete Primer erkennen sowohl attenuierte als auch Wildtyp-Stämme von YFV.

Die so erprobten Primer werden auch in Zukunft bei der molekularen Charakterisierung von Gelbfieberfällen zum Einsatz kommen.

III.3.2 Analyse der afrikanischen Gelbfieberfälle IvoryCoast1999 und Gambia2001

Die allgemeine Symptomatik (Fieber, Muskelschmerz, Kopfschmerz, Appetitlosigkeit, Übelkeit) bei YFV-infizierten Personen erschwert die Erkennung eines Gelbfieberfalles (YF-Fall) im frühen Stadium der Erkrankung. Eine schnelle diagnostische Klärung ist für die Einleitung geeigneter medizinischer Behandlungsmöglichkeiten und für die entsprechenden Sicherheitsmaßnahmen notwendig.

Proben von zwei nach Europa importierten YF-Fälle (IvoryCoast1999 und Gambia2001) wurden molekularbiologisch näher charakterisiert.

In den letzten Jahren hat sich die RealTime-PCR zu einer der schnellsten und sensitivsten Methoden in der Erregererkennung etabliert. Auch in diesen beiden importierten Gelbfieberfällen konnten mittels der in dieser Arbeit entwickelten TaqMan-PCR virale YFV-Nukleinsäure quantitativ bestimmt werden. Hohe Virustiter von 3×10^7 GE/mL und $2,4 \times 10^6$ GE/mL konnten jeweils in Leber und Niere im Gambia2001-Fall nachgewiesen werden. Dieser massive Befall konnte auch immunhistologisch und elektronenmikroskopisch untermauert werden (Abbildung III.13, Abbildung III.14). Makroskopische und histologische Befunde, die in Kooperation mit Stefan Pest (Charité, Berlin) durchgeführt wurden, offenbarten in beiden Fällen charakteristische Symptome einer hämorrhagischen Fieberinfektion, wie sie YFV-infizierte Personen zeigen [de Filippis et al. 2002; Centers for Disease Control and Prevention 2002]. In allen untersuchten Organen waren charakteristische Zeichen anhaltender Hypofusion und Schock in Folge von Leberversagen und Koma nachweisbar. Hauptpathologische Merkmale zeigten eine Zyanose und Gelbsucht. Ödeme begleitet von pleuralen (200 mL) und abdominalen (1000 mL) Blutergüssen, sowie petechiale Blutungen in den Nierenkapseln, in der Nierenumgebung, in den Weichgeweben des Mediastinalraumes und in der Mundschleimhaut waren zu beobachten. Milde bis moderate atherosklerotische Veränderungen der Arterien konnten beobachtet werden. Weiterhin litt der Gambia-Fall unter einem Magengeschwür mit gastrointestinalen Blutungen. Neuropathologische Untersuchungen zeigten ein ausgeprägtes Ödem des Gehirns und histologisch war eine neuronale Degeneration infolge Sauerstoffmangels erkennbar, jedoch zeigten sich hier weder Entzündungen noch Hämorrhagien.

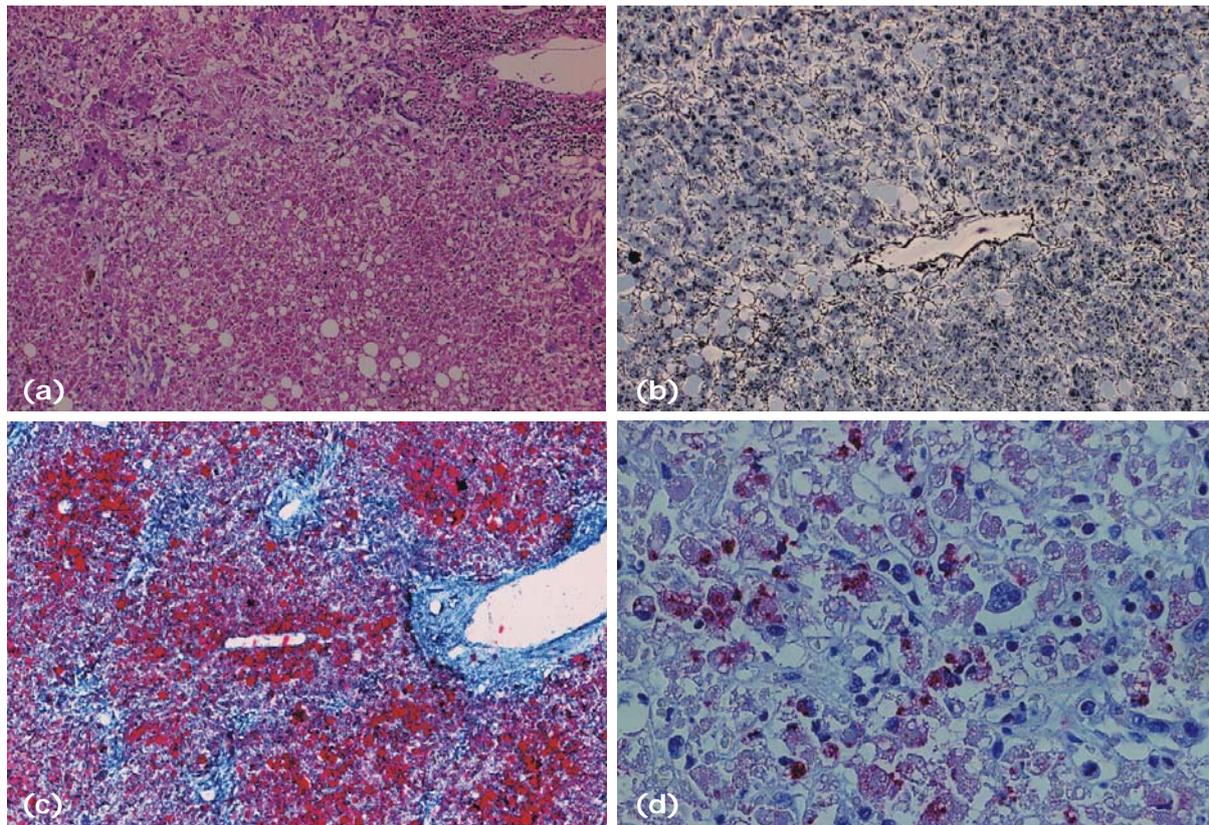


Abbildung III.13: (a) Überblick (50x). Lebergewebe mit typischen pathologischen Merkmalen einer letalen YFV-Infektion. Massive sublobuläre Nekrose (ca. 90%), Councilman Bodies und geringe bis moderate portale mononukleäre Infiltrate (H&E Färbung). (b) (50x). Extensive Makro- und Mikrovesikuläre Steatosis der Hepatozyten (rot bis orangene Fetttropfen). (c) (50x). Lipidfärbung. Gomorris Silber Imprägnation der Retikulinfasern zeigt eine fast erhaltene Architektur der Leber. (d) (100x). YFV-Färbung. Immunhistologische Detektion (MAK 6330) der viralen Antigene (rot) im Zytoplasma der Hepatozyten (Aufnahmen in Kooperation mit Stefan Pest, Charité Berlin).

Spezifische Symptome einer YFV-Infektion zeigten sich in beiden Fällen vor allem in der Leber, welche stark vergrößert war und eine extrem fragile Konsistenz des Parenchyms aufwies. Petechiale Blutungen deuteten eine subakute massive Lebernekrose an (Abbildung III.13). Histologische Untersuchungen bestätigen eine extensive subtotale lobuläre Nekrose (ca. 95 %). Der Abbau der Leber durch das Virus führte auch zu einem enormen Anstieg der Leberenzymaktivität (Teichman et al., 1999, Colebunders et al., 2003).

Elektronenmikroskopisch konnten Viruspartikel (Durchmesser 45-50 nm) in den Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums der Leber, nicht aber in den Nieren detektiert werden (Abbildung III.14).

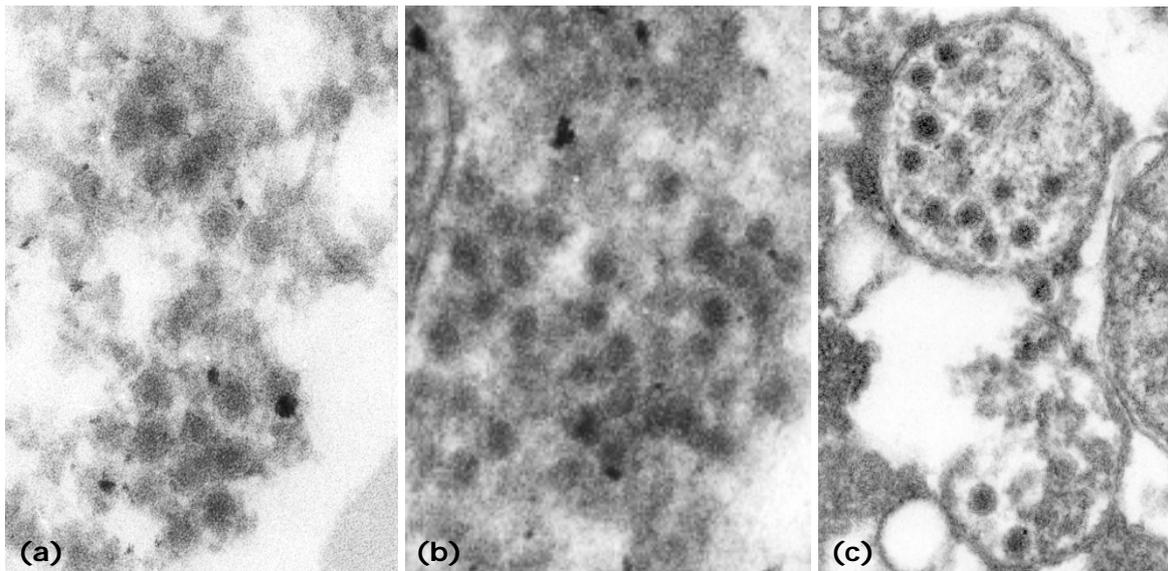


Abbildung III.14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von YFV-Partikel durch negative Kontrastierung sichtbar gemacht. (a) und (b) Biopsie-Material der Leber zeigt das Vorkommen von YFV-Partikeln. (c) Insekten-Zellen C6/36 infiziert mit YFV. Zellen und Gewebe wurden in 2,5 % Glutaraldehyd fixiert, gewaschen und mit 2 % Uranylacetat, 2% Osmium Tetroxid und 0,2 % Tannin Säure behandelt. Nach Dehydratation, wurden die Zellen in Epon 512 eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit 2 % Bleicitrat und 2 % Uranylacetat gefärbt.

Flaviviren zeigen zwar im Vergleich zu anderen behüllten Viren keine ausgeprägte Kapsidstruktur, trotzdem lassen sie sich in den Leber-Ultradünnschnitten nachweisen. Die Viruspartikel, die in der Zellkultur angezüchtet wurden, konnten auch elektronenmikroskopisch gefunden werden (Abbildung III.14).

Zur molekularbiologischen Analyse der importierten Gelbfieberfälle gehörten die vollständige Sequenzierung der beiden Virus-Isolate und ihre Einordnung in den Stammbaum für die afrikanischen Stämme. Für die Einordnung in einen Stammbaum wurde ein 670 bp repräsentativer Abschnitt nach Mutebi et al. [2001] verwendet. Dieser Ausschnitt beinhaltet die kodierende Region für drei Proteine (prM, M und E). Die beiden Stämme IvoryC1999 und Gambia2001 wurden im Stammbaum an Hand dieser Sequenz dem West Afrika II-Genotyp zugeordnet (Abbildung III.15 und III.16).

	10	20	30	40	50
Konsensus	CCAAGAGAGG	AGCCGATGAC	ATTGATTGCT	GGTGTATGGG	TGGAAAAGTA
Cons WAIT.....T..C..	A.....T		
Cons WAI IA.....C....	.G.....		
Gambia2001A.....C....	.G.....		
IvoryC99A.....C....	.G.....		
Angola71A..A..A..T..A..
Cons ECA	..C.....T..C..C..TT..A..
Cons EA	..T.....T..C..TT..A..A..
	60	70	80	90	100
Konsensus	GAGTGTCTATG	GAGTGTGACA	GAGGAGGTCA	GGGTCAGAGG	GCATTGATGC
Cons WAIT..	A.....A..CT...CG..	G..A.....
Cons WAI I	C..T.....C	..A.....C.	A.....CT..	..C...C...	..T..G..A..
Gambia2001	C..T.....C	..A.....C.	A.....CT..	..C...C...	..T..G..A..
IvoryC99	C..N.....C	..A.....T.	A.....CT..	..C...C...	..T..G..A..
Angola71	T..C.....G	..C.....A.	GA.....TG.	G..T...GC..A	..A..AAC..T.
Cons ECA	T..C.....G	..C.....A.	G.....TG.	..TG..G...	..A..A..C...
Cons EA	C..C.....A	..C.....A.	G.....TG.	..TG..A...	..A..AAC..T.
	110	120	130	140	150
Konsensus	CACGCATGAA	AACCATGGTG	AAGACCGGCA	GAAAATGGAT	GACTGGAGAA
Cons WAI	..C.....T	T.....C....C.....	T.....A..A.	
Cons WAI I	.A..A.....	C.....CT..	..T.....TT.....C
Gambia2001	.A..A.....	T.....CT..	..T.....NT.....C
IvoryC99	.N..A.....	C.....CT..	..T.....TT.....C
Angola71	.T..G..A..	G.....TC..A	..C..A....	.G.....AC..A..T.
Cons ECA	.T..G..A..TC..	..C.....	..T..C..A	C.....A..T.
Cons EA	.T..G..A..	A.....TC..	..C..A....T..C..	AC.....A..T
	160	170	180	190	200
Konsensus	TGGGTGAAGG	CAACTCCAAA	AGATTGAGAG	ATGGCTGTGA	GGAATCCTTT
Cons WAIA.....	..G..G....
Cons WAI IA..A.A.....A.....
Gambia2001A..A.A.....A.....	.G.....
IvoryC99A..A.A.....A.....
Angola71G..G..	.G.....	..C.....G.....G.....
Cons ECAG..G..A	..C.....GC.....
Cons EA	..A..G..G.G..C.....GC.....
	210	220	230	240	250
Konsensus	TTTGCGTACA	GCTTGCCATT	GCCTACCTGT	GGGACAACAT	GACGCAACGG
Cons WAIT.....C..	C.....A..C..G..	..C.....
Cons WAI IT.....C..C..A..GTC..A	
Gambia2001T.....C..A..GG..T..A	
IvoryC99T.....C..C..A..GG..C..A	
Angola71A..G..T.A..G..CA..G
Cons ECAC..G.G.....	A.....G..	..C..CA..A.C..G.
Cons EAC..GA.....	A.....A..	C.....C..ACC..G

Abbildung III.15: Nukleotid Sequenz Alignment für die distalen 250 Nukleotide des prM/M-Protein-Gens der Konsensus Sequenz von fünf YFV-Genotypen aus Afrika. Dieses Alignment zeigt die Nukleotid-Variation unter den verschiedenen Genotypen auf. Punkte zeigen die Gleichheit mit der Konsensus-Sequenz. Cons WAI: Konsensus Sequenz der West Afrika I Genotypen-Stämme, Cons WAI I: Konsensus Sequenz der West Afrika II Genotypen-Stämme, Cons ECA: Konsensus Sequenz der Ost/Zentral Afrika Genotypen-Stämme, Cons EA: Konsensus Sequenz der Ost Afrika Genotypen-Stämme.

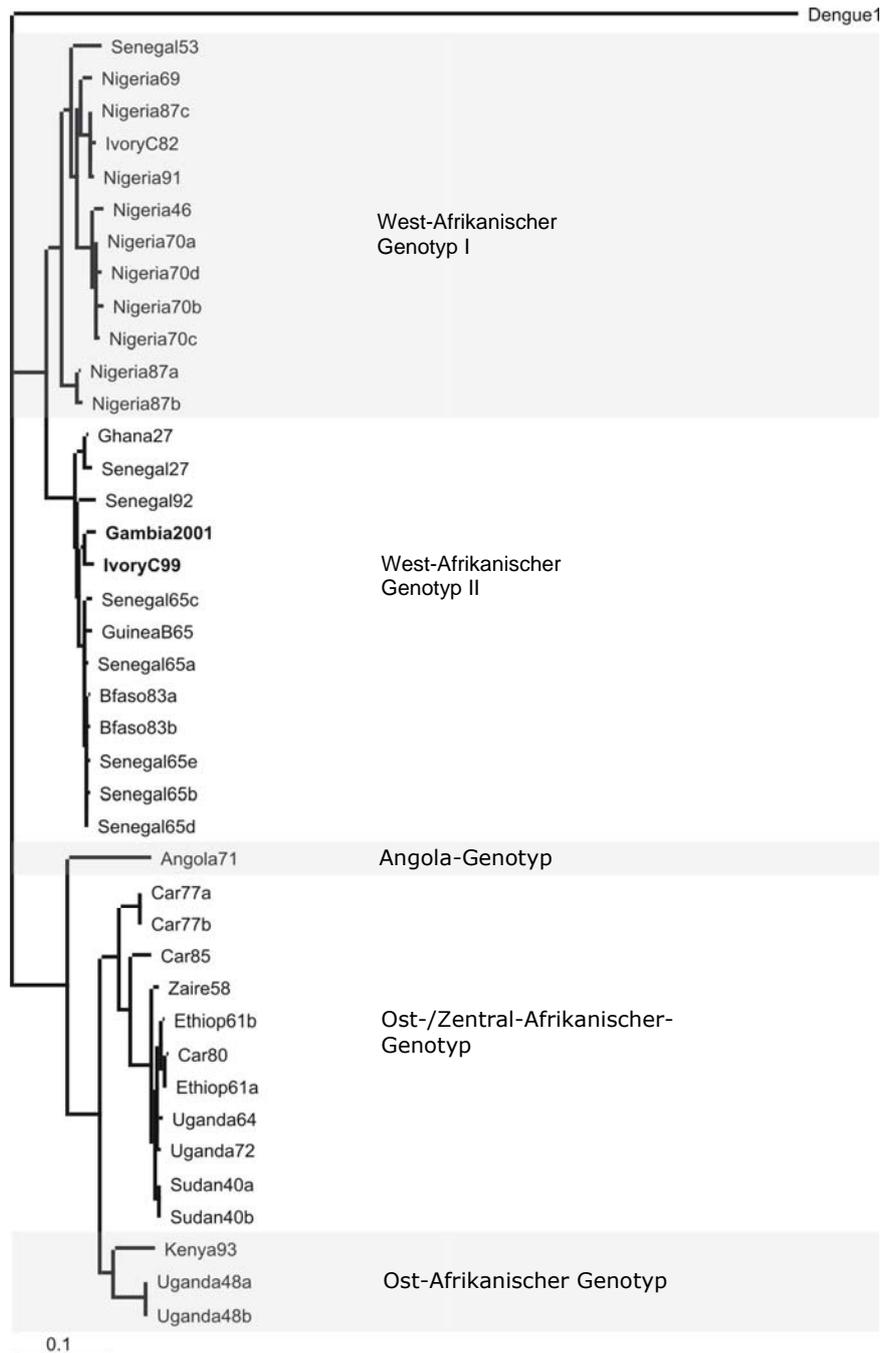


Abbildung III.16: „Neighbour-joining“ Phylogramm der Nukleotid-Sequenz von der prM/E-Region von 40 YFV-Wildtyp-Stämmen aus Afrika. Fett markiert sind die zwei importierten Fälle. Als Außengruppe wurde das Dengue1-Virus (Flaviviridae) genommen.

Die komplette Konsensus-Sequenz beider Stämme wurde außerdem mit dem Asibi-Stamm verglichen. Der Vergleich zeigte Nukleotid-Austausche über das ganze Genom verteilt. Die Nukleotidvariationen zwischen den Sequenzen sind in Tabelle III.11 zu sehen. 394 divergente Positionen (3,6 %) und 367 (3,4 %) wurden jeweils für Gambia2001 und IvoryC1999 gefunden. Es gab keine auffällig signifikanten Unterschiede in einzelnen Genabschnitten, abgesehen vom E-Protein, das die höchste Variabilität (4,3 bis 5 %) zeigt (Tabelle III.11).

TABELLE III.11:
Nukleotidaustausche zwischen IvoryC1999 und Gambia2001 im Vergleich zu Asibi

Genomregion	Länge (nt)	Anzahl der Mutationen (%)	
		Gambia2001	IvoryC1999
5' - NTR	118	0 (0.0)	0 (0.0)
Capsid	363	13 (3.6)	10 (2.6)
Pre-M	267	6 (2.2)	7 (2.6)
M	225	11 (4.9)	6 (2.7)
E	1479	74 (5.0)	63 (4.3)
NS1	1056	33 (3.1)	33 (3.1)
NS2A	672	21 (3.1)	23 (3.4)
NS2B	390	15 (3.8)	14 (3.6)
NS3	1869	71 (3.8)	67 (3.6)
NS4A	447	15 (3.4)	16 (3.6)
NS4B	750	28 (3.7)	27 (3.6)
NS5	2715	94 (3.5)	93 (3.4)
3' - NTR	511	13 (2.5)	8 (1.6)
Total	10862	394 (3.6)	367 (3.4)

III.4 Untersuchung der Immunantwort nach Gelbfieberimpfung bzw. -infektion

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die durch die Gelbfieber-Impfung vermittelte zelluläre Immunantwort an einem Kollektiv geimpfter Probanden (Impflinge, n=14) untersucht und zum anderen an Personen, die sich mit Gelbfieber infiziert haben (YFV_{Inf}). Diese beiden Gruppen wurden hinsichtlich ihrer zellulären Immunantwort unter besonderer Berücksichtigung der Zytokine betrachtet. Die Ausschüttung der Zytokine wurde dann mit den Zytokinen von YFV-impfassoziierter Gelbfieberfälle verglichen.

III.4.1 Zytokinantwort nach Gelbfieberimpfung und -infektion

Th-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Steuerung der Immunantwort. Dabei ist die Sekretion von Effektorproteinen (Zytokinen) durch die Th-Zellen ein wesentlicher Mechanismus, über den die Immunantwort moduliert wird.

Alle 14 Impflinge vertrugen die Gelbfieberimpfung sehr gut und es zeigten sich keine Nebenwirkungen. Vor der Impfung und an sechs Zeitpunkten nach der Impfung wurden acht verschiedene Zytokine bestimmt.

Da die FACS-Analysen keine Aussagen über die Klasse der reaktiven T-Zellpopulation und der Häufigkeit spezifischer T-Zellen erlaubten, wurde zur Bestimmung der Immunantwort die Zytokinausschüttung analysiert. Zuerst wurde die impfinduzierte zelluläre Immunantwort über die Zytokinausschüttung mit einem ELISA gemessen. Es gab jedoch nicht von allen Probanden genug Serum und die Sensitivität des ELISA schien im Vergleich zur Nukleinsäure-Detektion zu gering. Daher wurde die Zytokinausschüttung aus stimulierten peripheren Blutlymphozyten (PBL) ermittelt. Das untersuchte Kollektiv der Lymphozyten-Donoren wurde dabei in Erstimpfungen (n=9) und Wiederimpfungen (n=5) aufgeteilt. Die PBLs wurden vor der Messung der Zytokine mit TPA/Ionomycin und CD3/CD28 stimuliert.

Es wurde die mRNA der Zytokine Interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) und Interferon (INF)- γ in Relation zu β -Aktin gemessen. Seit einigen Jahren werden die T-Helfer-Lymphozyten auf der Basis der von ihnen produzierten Zytokine weiter unterteilt: Während TH1 Zellen IL-2, IL-3 und IFN γ synthetisieren, erfolgt

nach Stimulation von TH2-Zellen die Ausschüttung der Interleukine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. GM-CSF ist TH1 und TH2 zuzuordnen.

Vor der Impfung wurde die Zytokinausschüttung der Zellen eines jeden Probanden gemessen und als Referenzwert (=1) für alle folgenden Messungen genutzt. Acht Zytokine wurden an sechs aufeinander folgenden Tagen (2, 3, 4, 5, 6, 13 dpv) mit der TaqMan-PCR quantitativ gemessen (Tabelle III.12).

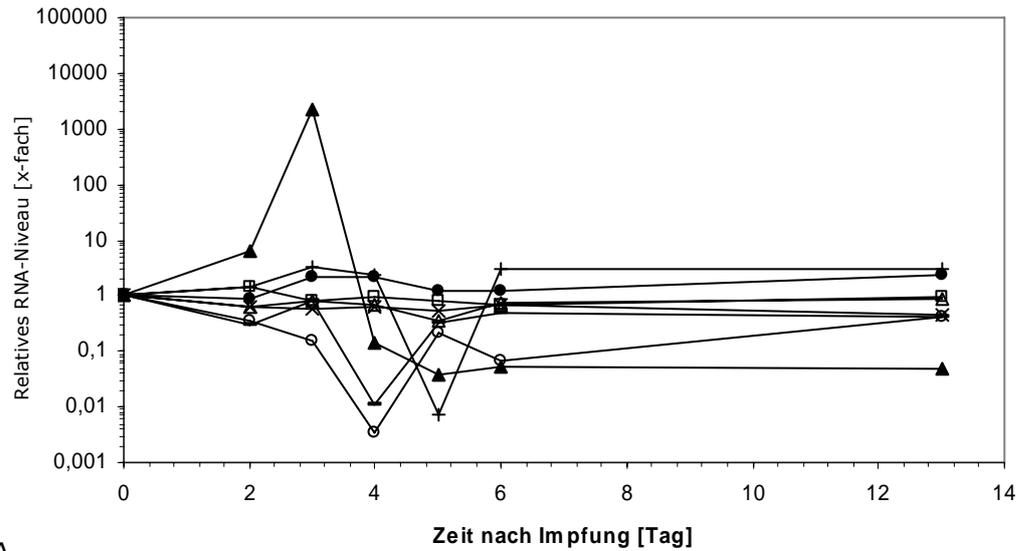
TABELLE III.12:
Stärke der Zytokinausschüttung von Impfungen nach Gelbfieber-Impfung.

		TH1		TH1		TH1/TH2		TH2		TH2		TH2		TH2			
		IL-2		IL-3		INF g		GMCSF		IL-4		IL-5		IL-10		IL-13	
		TPA	CD	TPA	CD	TPA	CD	TPA	CD	TPA	CD	TPA	CD	TPA	CD	TPA	CD
Gruppe 1	1	++	++	++	++	-	++	-	++	++	++	-	++	++	-	++	
	2	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	++	-	++	++	+	-	+	-	+	-	+	-	+	++	-	
	4	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	++	
	5	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Gruppe 2	6	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++	-	++	
	7	-	++	-	-	++	++	++	-	++	++	-	+	++	+	++	
	8	++	-	-	-	-	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	
	9	-	+	+	++	-	-	++	++	+	+	+	+	-	++	++	
	10	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	++	++	++	++	
Gruppe 3	11	+	-	++	-	+	-	++	-	+	-	+	-	++	+	+	
	12	++	++	++	++	-	-	++	++	+	++	-	+	++	-	-	
	13	-	-	-	-	+	-	+	-	++	-	-	+	++	++	-	
	14	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	

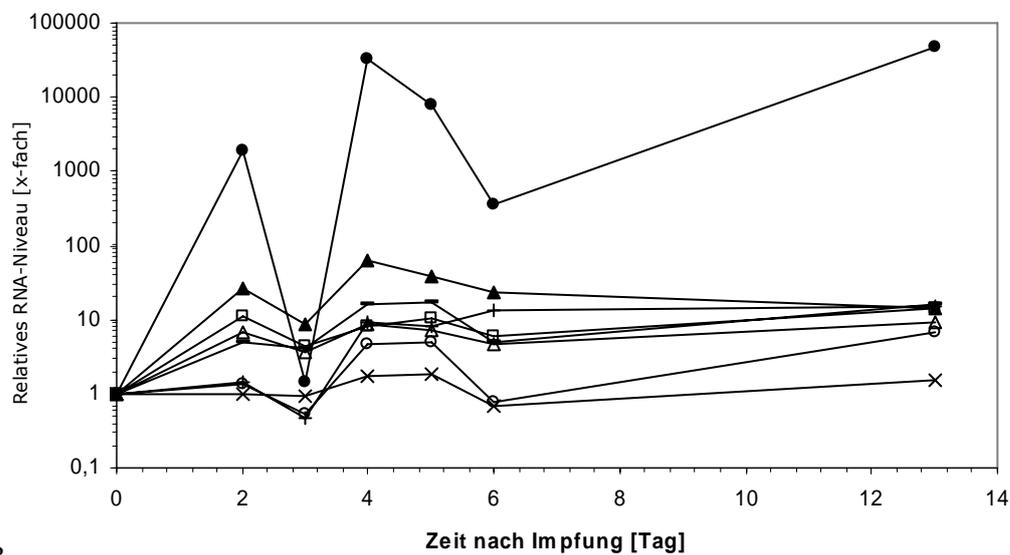
'+' zeigt einen Anstieg bzw. Abfall von mehr als 2,5-fach an, '++' zeigt einen Anstieg bzw. Abfall von mehr als 5-fach an und '-' zeigt einen Anstieg bzw. Abfall von weniger als 2-fach an (in einem Zeitraum von 13 Tagen nach Impfung). In Gruppe 1 befinden sich die Wiederimpfungen, in Gruppe 2 die Erstimpfungen mit PCR positiven, aber Plaque-Assay negativen Ergebnissen und in Gruppe 3 befinden sich die Erstimpfungen, die PCR und Plaque-Assay positiv sind.

Die Impfungen wurden in drei Gruppen eingeteilt, Gruppe 1 repräsentiert die Wiederimpfungen, in Gruppe 2 sind die Erstimpfungen, die YFV-PCR positiv, aber Plaque-Assay negativ waren und in Gruppe 3 befinden sich die Erstimpfungen, die sowohl YFV-PCR und Plaque-Assay positiv waren. Die Zytokinveränderungen wurden als 2,5- (+) bzw. 5-fachen (++) Anstieg/Abfall zum Referenz-Wert vor der Impfung gemessen.

Die Messung der mRNA der verschiedenen Zytokine zeigte ein inkonsistentes Bild für die jeweiligen Impfungen. Nach YFV-Impfung konnten sowohl TH1- als auch TH2-Zytokine gemessen werden. Tabelle III.12 zeigt, dass weder die TH1- noch TH2-Antwort nach YFV-Impfung dominiert.



A

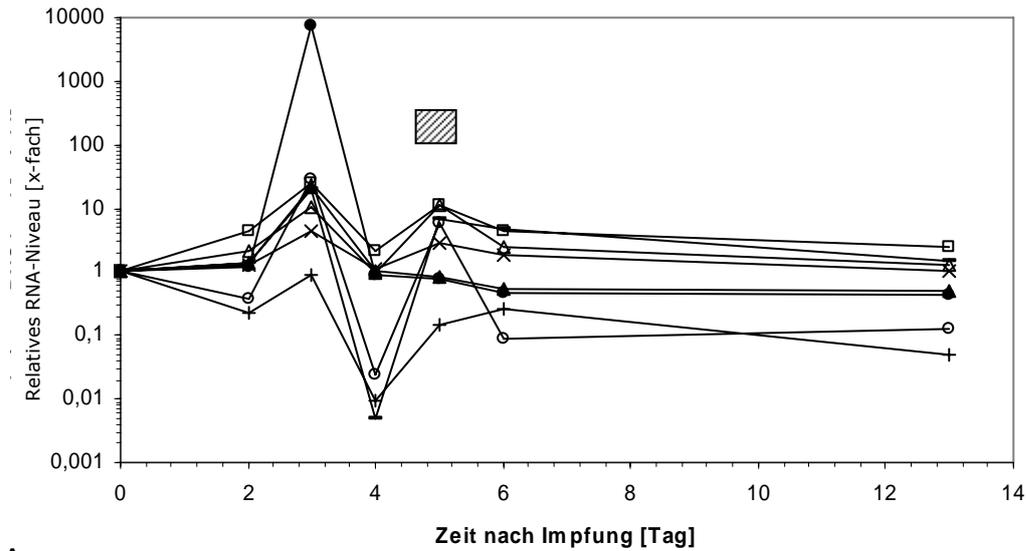


B

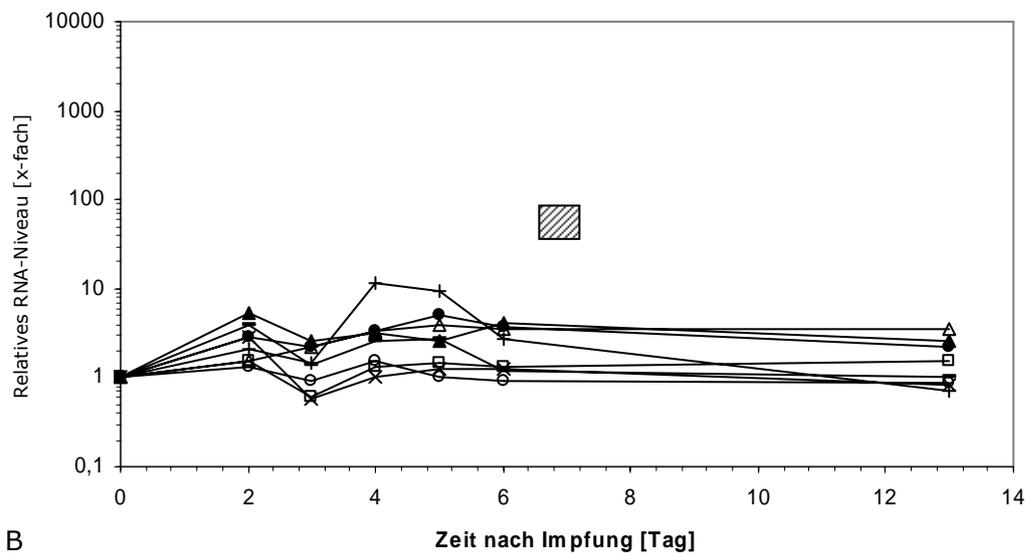
—△— IL-2 —□— INF-g —▲— IL-3 —×— IL-5 —○— IL-4 —◇— IL-13 —+— IL-10 —●— GM-CSF

Abbildung III.17: (A+B) Zytokin Expression der PBLs von zwei Wiederimpfungen. Die untersuchten Zytokine sind entsprechend gekennzeichnet. Der relative RNA-Gehalt wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Es konnte ein Anstieg der Zytokin-mRNA kurz nach der Impfung bei fast allen Personen beobachtet werden. Außerdem zeichnete sich oft ein charakteristischer biphasischer Verlauf der Zytokin-mRNA-Menge aus. Es konnte jedoch kein klares Zytokinmuster, das nach einer YFV-Impfung folgte, ausgemacht werden. Weder für die Erstimpfungen, noch für die Wiederimpfungen. Jeweils zwei Beispiele für einen Zytokinverlauf von Wiederimpfungen, wie von Erstimpfungen werden in Abbildung III.17 und Abbildung III.18 gezeigt.



A

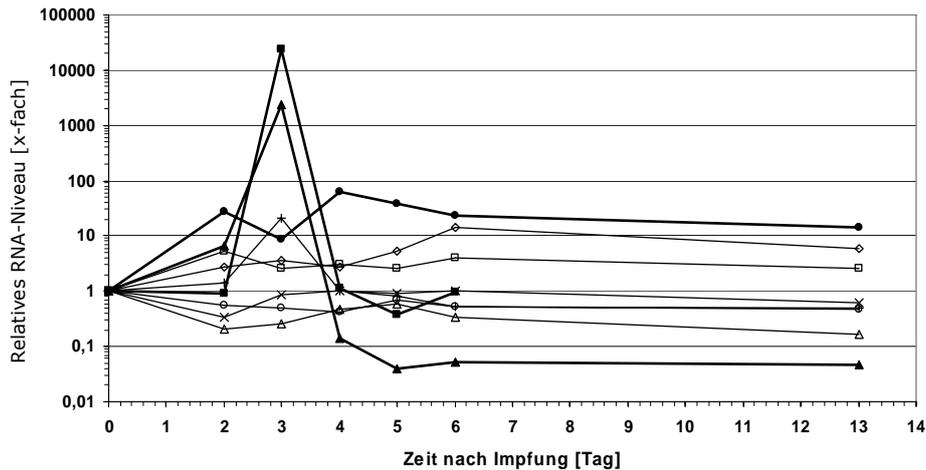


B

—△— IL-2 —□— INF-g —▲— IL-3 —×— IL-5 —■— IL-4 —◇— IL-13 —+— IL-10 —◆— GMCSF

Abbildung III.18: (A+B) Zytokin Expression von zwei Erstimpfungen. Gestreifter Kasten=YFV-PCR positiv, aber Plaque-Assay negativ am jeweiligen Tag. Der relative mRNA-Gehalt wurde gegen die Zeit aufgetragen.

IL-3 zeigte hohe Werte bei den Wiederimpfungen, sowie bei den Erstimpfungen und unterschied sich so von den übrigen Interleukinen durch den starken Expressionsanstieg (Abbildung III.19). Besonders die Wiederimpfungen zeigten einen starken IL-3-Anstieg.



-----FV1 -x---FV2 -o---FV3 -o---FV4 -o---FV5 -o---FV6 ●---RV1 ▲---RV2 ■---RV3

Abbildung III.19: Relativer mRNA Level von IL-3. Gefüllte Symbole mit dicker durchgehender Linie repräsentieren den Verlauf von IL-3 mRNA in Wiederimpfungen und leere Symbole mit dünnen Linien repräsentieren den Verlauf von IL-3 mRNA in Erstimpfungen. FV = Erstimpfung (first time vaccinee), RV = Wiederimpfung (revaccinee).

Um den Beitrag der Zytokine in der Pathogenese von Wildtyp-Gelbfieberinfektionen zu untersuchen und diese mit denen der Impflinge zu vergleichen, wurden Proben von Patienten, die sich mit YFV-infiziert hatten, in Kooperation mit Jan ter Meulen (Philipps Universität Marburg) hinzugezogen. Sieben Patienten hatten eine fatale Gelbfieberinfektion (f-YF), elf Patienten entwickelten eine nicht fatale hämorrhagische (nf/h-YF) und 18 Patienten eine nicht fatale nicht hämorrhagische Gelbfieberinfektion (nf/nh-YF).

Die Werte des Interleukin (IL)-6, des Monozyten chemoattraktanten Proteins-1 (MCP-1), des Interferon-induzierenden Proteins (IP)-10, des Tumor Nekrosisfaktor- α (TNF- α) und des IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1RA) sind höher in f-YF-Patienten als in nf/nh-YF. In Patienten mit nf/h-YF, sind nur IP-10 und IL-1RA erhöht (Abbildung III.20). Die erhöhten Werte der proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokine, begleitend zur Virämie in f-YF-Patienten, aber nicht in nf-YF-Patienten, könnten die Schwere der Krankheit widerspiegeln. Auch in Patienten mit refraktärem Schocksyndrom sind diese hohen Zytokinwerte gefunden worden [Hotchkiss und Karl, 2003].

Während unter den Impfungen (Erstimpfinge, Wiederimpfinge) die Zytokinausschüttung nicht klar voneinander zu unterscheiden ist, sind die Zytokinwerte bei YFV_{Inf} umso höher, je stärker das Krankheitsbild ist.

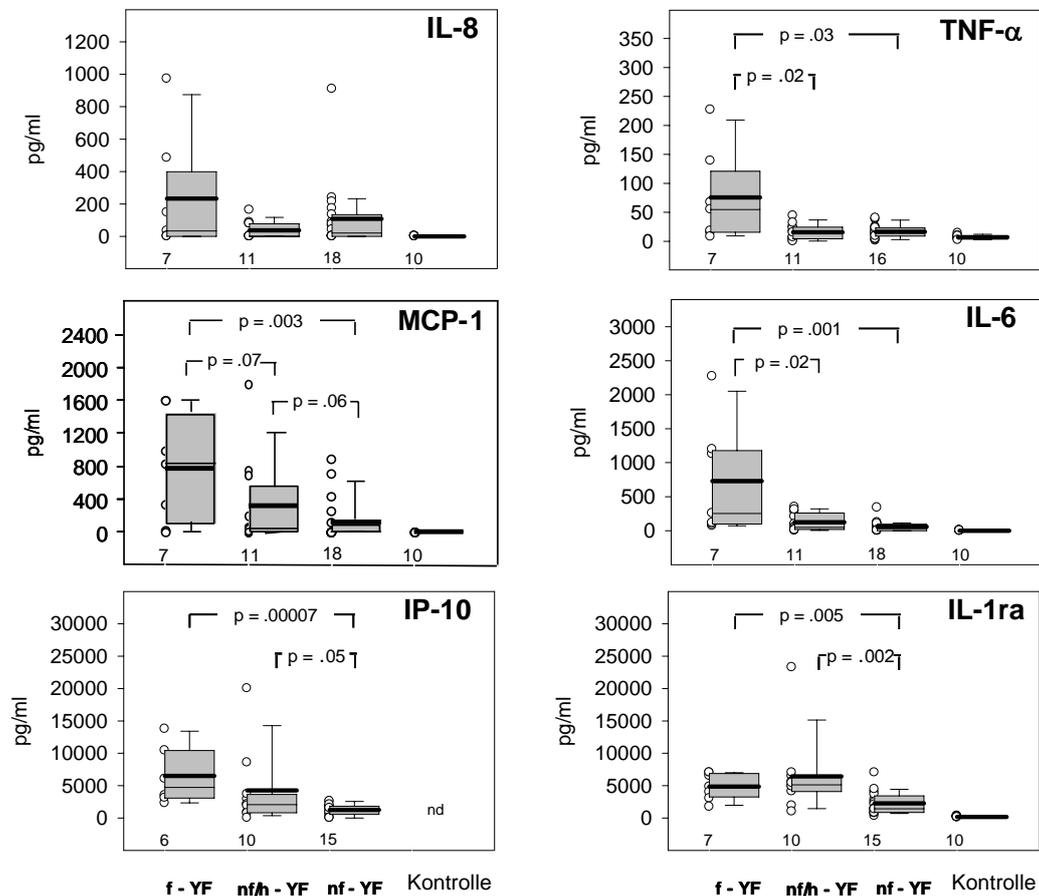


Abbildung III.20: Interleukin (IL)-8, Tumor Nekrosis Faktor alpha (TNF- α), Monozyten chemoattraktantes Protein (MCP)-1, Interleukin (IL)-6, Interferon-induzierendes Protein (IP)-10 und Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) in Serumproben aus Patienten mit fatalem Gelbfieber (f-YF), nicht-fatalem aber hämorrhagischen Gelbfieber (nf/h-YF), nicht-fatalen und nicht-hämorrhagischen Gelbfieber (nf-YF) sowie gesunde Kontrollen. Kreise repräsentieren Werte für ein einzelnes Individuum, graue Balken repräsentieren die 25.-75. Perzentile, Dicke und dünne horizontale Linien mit Balken repräsentieren jeweils den Durchschnitt und den Medianwert, und die Fehlerbalken zeigen die 95. Perzentile an. Die Zahlen unter jedem Balken repräsentieren die Anzahl der Patienten pro Gruppe, die getestet wurden (jeder Patient wird von einem Kreis repräsentiert). Die P Werte statistisch signifikanter Unterschiede unter den Gruppen sind ebenfalls gezeigt (Mann-Whitney U Test). In den Kontrollgruppen, die aus Serumproben gesunder Personen aus dem YF-Endemiegebiet bestanden, lagen die Werte so niedrig, dass die Fehlerbalken in diesem Maßstab nicht dargestellt werden können. (Ter Meulen et al., 2004).

III.4.2 Analyse der Gelbfieberimpfassozierten Erkrankungen

In den vergangenen zehn Jahren traten zunehmend Impfwischenfälle (YEL-AE) auf. Dabei kann zwischen Impfkomplikationen mit und ohne Todesfolge unterschieden werden. Die Ursache dieser neurotrophen oder viszerotropen Impfwischenfälle (YEL-AND bzw. YEL-AVD) ist bisher nicht geklärt. In Abbildung III.21 sind alle registrierten viszerotropen Impfwischenfälle (YEL-AVD) von 1975 bis 2005 aufgelistet, wobei 17 von 35 Fällen verstorben sind.

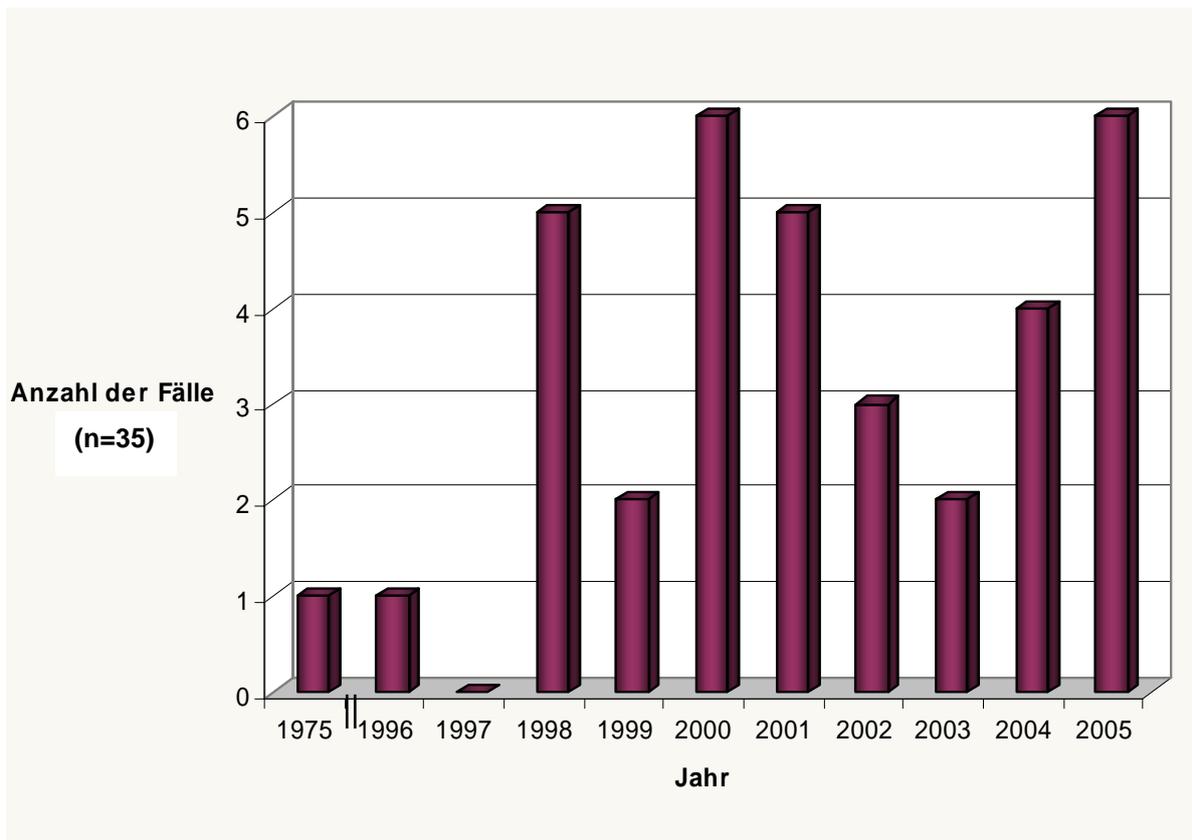


Abbildung III.21: Impfwischenfälle nach Gelbfieberimpfung zwischen den Jahren 1975 und 2005.

Da keine schlüssigen Erklärungen für die schweren Verläufe nach YFV-Impfung vorliegen, sollen vor allem auch auf immunologischer Seite die Daten von YFV-impfassoziierter Erkrankungen (YEL-AE) mit Personen, die eine Wildtyp-YFV-Infektion (YFV_{Inf}) hatten und mit Personen, in denen die Impfung ohne Zwischenfälle (Impflinge) verlaufen ist, verglichen werden.

Nach Untersuchungen der bisherigen YEL-AEs, scheinen die Komplikationen, die bei den YEL-AEs aufgetreten sind für eine wirtsabhängige Reaktion zu sprechen. Kein YFV, das aus YEL-AEs isoliert werden konnte, zeigte wesentliche molekulare

Veränderungen, die diese schweren Verläufe erklären könnten. Daher wurden nun mehr die humanphysiologischen Parameter untersucht werden.

Da die YEL-AVD-Fälle erst seit 1996 definiert und registriert werden, gibt es seitdem vermehrt genauere Untersuchungen zu diesen Fällen. Bisher sind 35 YEL-AVD-Fälle registriert worden, davon doppelt so viele Männer wie Frauen. Das Durchschnittsalter beträgt 48,8 Jahre (4-79 Jahre), wobei auffallend viele über 60 Jahre alt waren, sodass man von einem altersabhängigen Auftreten ausgehen muss. Außerdem hatten 17 % der Betroffenen eine Thymuserkrankung mit einer erfolgten Thymektomie.

In Zusammenarbeit mit Cristina Domingo Carrasco (Instituto de Salud Carlos III, Spanien), Sandrine Milas (Maladies Infectieuses, Belgium), Marjan Van Esbroeck (Prince Leopold Institute for Tropical Medicine Antwerpen, Belgien), Prof. Dr. med. Weber (Siloah Krankenhaus Pforzheim, Germany) und Herbert Schmitz (Bernhard Nocht Institut, Deutschland) wurden in Europa aufgetretene Impfwischenfälle aufgenommen und charakterisiert, besonders hinsichtlich ihrer Immunantwort. In Tabelle III.13 sind die verdächtig gemeldeten YEL-AVD bzw. -AND-Fälle seit 1999 aufgelistet, wobei die dick markierten Fälle in dieser Arbeit näher untersucht wurden. Dabei handelte es sich um fünf nicht fatale Fälle (GB-03-06, BE-10-05, ES-08-05, DE-07-05, ES-09-02) und um einen fatalen Fall (ES-10-04). Dazu wurde Probenmaterial von zwei weiteren Personen untersucht, die nach der Impfung keine Nebenwirkungen zeigten.

Die Einteilung der YEL-AE in verdächtige, wahrscheinliche und sichere YEL-AE-Fälle wurde nach den in Kapitel II.2.10 dargestellten Kriterien vorgenommen. Berücksichtigt man alle bisherigen YEL-AVD-Fälle, finden sich im Allgemeinen folgende Symptome: Auftreten der Symptome in der Regel in den ersten zehn Tagen nach Impfung: Fieber, Muskel-, Gelenk- und Kopfschmerzen, Erbrechen, erhöhte Leber- und Bilirubinwerte, Leberversagen, Thrombozytopenie, Lymphozytopenie, disseminierte intravasale Gerinnung (DIG), Rhabdomyolyse, Hypotonie (vasopressorische Maßnahmen erforderlich), Nierenversagen (Dialyse erforderlich), Respiratorische Insuffizienz (Intubation notwendig) und Myokarditis.

TABELLE III.13:
YEL-AVD und YEL-AND-Fälle zwischen 1999 und 2005

YEL AE Klassifizierung	Patient CC- Impfdatum	Sex /Alter	Onset [dpv]/ Tage im KH	PCR [GE/mL]	Virus- Isolation	NT [1/x] (dpv)	IF [1/x] (dpv)	Leberenzyme max. Werte (dpv)			
								GPT	GOT	GGT	
S	SZ-03-06*	M / 71	7 / 4	-	-	50 (12)	100 (12)	-	-	-	
S	GB-03-06	M / 47	5 / 1	-	-	80 (11)	500 (11)	65 (11)	-	321 (18)	
S	BE-10-05	M / 61	5 / 9	-	-	74 (13)	100 (13)	349 (8)	189 (9)	459 (9)	
D	ES-08-05	M / 64	4 / 8	1,0E+05	-	1024 (15)	128 (15)	79 (11)	109 (11)	259 (16)	
P	DE-07-05	M / 67	9 / 26	1,0E+03	-	nd	10240 (18)	236 (16)	392 (16)	1345 (16)	
YEL- AVD	S	FR-06-05	F / 52	? /	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	S	ES-06-05	M / 30-40	4 / -	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	D (f)	ES-10-04	F / 26	3 / 4	9,0E+07	+	512 (8)	IgM+	242 (8)	114 (8)	-
	S	DE	M / 71		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	S	FR	M / 64		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	S	SZ	M / 50		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	D (f)	AU	M / 56		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S	ES-06-05	F / 27	12 /	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
S	DE-08-04	M / 76	? /	-	nd	512	5120	nd	nd	nd	
YEL- AND	S	ES-09-02	F / 34	6 / 15	-	1024 (12)	<80, 128#	14 (12)	15 (12)	-	
	S	FR	M / 13		nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	S	ES-08-99	M / 33	3-4 /	-	1024 ()	nd	nd	nd	nd	

CC: Ländercode, Sex: Geschlecht, M: männlich, F: weiblich, Onset: Auftreten erster Symptome, KH: Krankenhaus, BE: Belgien, DE: Deutschland, ES: Spanien, FR: Frankreich, GB: Großbritannien, SZ: Schweiz, S: verdächtig, P: wahrscheinlich, D: sicher, (f): mit fatalem Ausgang, dpv: Tage nach Impfung, NT: Neutralisationstest, IF: Immunfluoreszenztest, GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase (Referenzbereich: 5 - 60 IU/L), GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Referenzbereich: 5 - 43 IU/L), GGT: Gamma-Glutamyltranspeptidase (Referenzbereich: 5 - 80 IU/L), nd: nicht vorhanden bzw. nicht untersucht, #: LCR (Liquor Cerebrospinalis) positiv. Dick markierte Fälle sind im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht worden.

III.4.2.1 YEL-AVD mit fatalem Ausgang

Am 14. Oktober 2004 wurde einer Frau (26 Jahre) aus Onuba (Spanien) neben einer Dosis Gelbfieberimpfstoff (Stamaril, LOT X-5424-3, Aventis Pasteur) auch eine Impfung gegen Diphtherie und Tetanus entsprechend der Vorschriften verabreicht. Drei Tage später klagte sie über Schmerzen am rechten Arm (Impfarm), wo Zeichen einer Entzündung bemerkbar waren. Mit Gelenkschmerzen und Fieber von 38,2 °C besuchte sie das Juan Ramon Jimenez Hospital in Huelva (Spanien), das ihr Acetaminophen und Ibuprofen verschrieb. Am 21. Oktober kehrte sie in die Notaufnahme des Hospitals zurück und klagte über Unterleibsschmerzen, Übelkeit, Diarrhoe und anhaltendem Fieber. Die weiteren Laborbefunde, die vom Juan Ramon Jimenez Hospital erhoben wurden, sind in Tabelle III.14 aufgelistet.

TABELLE III.14:
Laborwerte des fatalen YEL-AVD-Falles in Spanien 2004

	<u>7 dpv</u>	<u>8 dpv</u>	<u>9 dpv</u>	<u>10 dpv</u>
Temperatur [°C]	37,4 - 39,4	39,5	39,6	38,2
Blutdruck [mm Hg]	77/46			
Herzfrequenz [per min]	140			
SPO ₂	100			
Hämoglobin [g/dL]	14,2	12,5	11,2	11,3
Hematokrit [%]	43,4	35,5	32	31,8
Thrombozyten [per µL]	35000	26000	15000	
Weiße Blutkörperchen [per µL]	8400	18900	35400	73700
Bands [%]	39	23		
Neutrophile [%]	57	70		
Lymphozyten [%]	3	3		
Monozyten [%]	1	2		
Basophile [%]		2		
Kreatinin [mg/dL]	1,63	1,46	2,03	2,05
Harnstoff [mmol/L]	16,3	24,8	29,4	17,7
Aspartat Aminotransferase AST [IU/L]	318	242		
Alanin Aminotransferase ALT [IU/L]	161	114		
Gesamt Bilirubin [mg/dL]	1,52	1,95	3	3,14
Prothrombin Zeit	1,91	2,16		
aktivierte partielle Thromboplastinzeit [APTT]	2,03	2,51		
D-dimer [ng/dL]	3055,8	2135,5		
Fibrinogen [mg/dL]	203	74		
pH			7,16	7,1
Lactat Dehydrogenase [IU/L]	1825	2433		
Urin [Häufigkeit/Gesamt mL]	2/400	11/1250	2/250	

dpv: Tage nach Impfung. AST=GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Referenzbereich: 5 - 43 IU/L), ALT=GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Referenzbereich: 5 - 60 IU/L).

Die Patientin wurde mit einer Gelbfieberimpfassozierten Erkrankung diagnostiziert, die schnell voranschritt und nicht erfolgreich behandelt werden konnte. Zehn Tage nach YFV-Impfung entwickelte die Patientin einen refraktären Schock und verstarb am 24. Oktober 2004, sieben Tage nach Beginn der ersten Symptome. Durch die Untersuchung von Blut, Stuhl und Urin konnten andere Erreger (Zytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Hepatitis A, B oder C Viren, HIV, Herpes Virus, Varicella-Zoster Virus, Influenza A oder B und Parainfluenza Viren, Respiratorisches Syncytial Virus, Adenovirus, Leptospira interrogans, Rickettsia connori, Coxiella burnetti und Legionellen) als Todesursache ausgeschlossen werden. Die serologische Untersuchung ergab einen Hinweis auf frühere Infektionen mit Epstein-Barr Virus, Herpes Virus I und II, Varicelle-Zoster Virus, Influenza B Virus und Respiratorisches-Syncytial Virus, was aber als normaler Befund interpretiert werden kann und nicht im Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung zusammenhängt.

In der allgemeinen Flavivirus RT nested PCR wurden Probenmaterial von Leber, Niere, Plasma und Serum positiv getestet, wohingegen im Vollblut keine YFV-Nukleinsäure nachgewiesen werden konnte. Die Bestimmung der YFV-RNA in der quantitativen TaqMan-PCR ergab hohe Konzentrationen in Leber und Niere (6.2×10^9 und 8.4×10^8 Genom Äquivalente (GE)/g).

Acht Tage nach der Impfung (dpv) konnten spezifische anti-YFV-Antikörper vom Typ IgM, aber kein IgG durch indirekte Immunfluoreszenz mit YFV-17D als Antigen nachgewiesen werden. Neutralisierende Antikörper im Serum wurden mit einem Mikroneutralisations-Assay bestimmt. Ein Endpunkt-Titer von 1:512 (NT 50%) wurde im Serum (8 dpv) gemessen.

Die Vollängen-Sequenzierung sollte Auskunft darüber geben, inwieweit sich das Impfvirus im Körper verändert hatte und dies die mögliche Erklärung für den fatalen Ausgang sein könnte. In dem Vergleich der YFV-Vollängen-Sequenzierung des Patientenisolates mit dem YFV-17D (Stamaril[®], Aventis Pasteur) ergab über die Gesamtlänge von 10.862 Nukleotiden nur zwei Nukleotidsubstitutionen (4054: C→T, 6418: T→C, Genbank DQ118157), die allerdings zu keinem Aminosäureaustausch führten.

III.4.2.2 YEL-AVD im Vergleich zur YFV-Impfung ohne Komplikationen

Wenn man YEL-AVD-Fälle mit Impfungen (ohne Nebenwirkungen) vergleicht, dann zeigte sich bereits in den Ergebnissen der Zellkultur, dass sich die Viren in den YEL-AVD-Patienten mit fatalem Ausgang (YEL-AVD_{Fat}) stärker vermehren und somit auch die Viren zu einem früheren Zeitpunkt nachgewiesen werden konnten (Abbildung III.22).

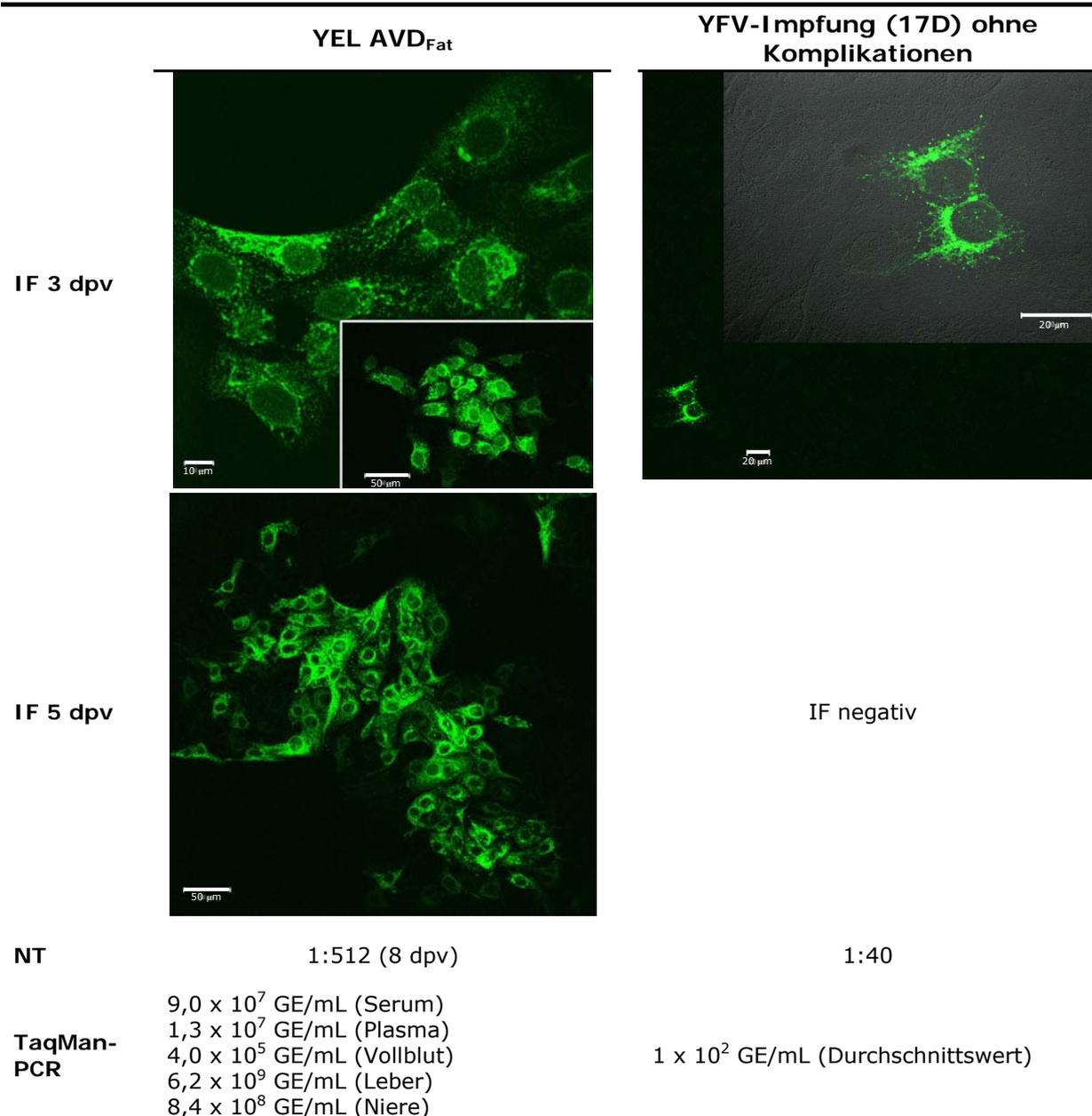


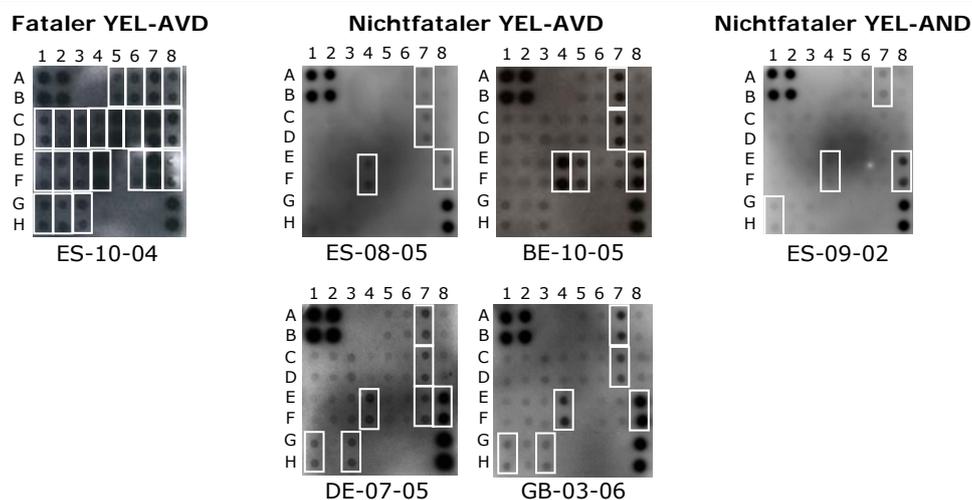
Abbildung III.22: Vergleich zwischen einem fatalen YEL-AVD-Fall mit einem Fall ohne Impfkomplicationen. Direkte und indirekte Bestimmung von YFV mittels Immunfluoreszenz (IF) auf Vero E6 Zellen, Neutralisationstest (NT) und TaqMan-PCR.

Der Titer der neutralisierenden Antikörper liegt bei den YEL-AVD_{Fat} und YEL-AVDs ohne Todesfolge höher als bei den Personen, die keine Impfkomplicationen

zeigten. Die Viruslast der YEL-AVD_{Fat} liegt deutlich höher und ist über einen viel längeren Zeitraum messbar. Die Viruslast von YEL-AVDs ohne Todesfolge ist dagegen vergleichbar mit denen normaler Impflinge ohne Komplikationen. Die Laborbefunde des YEL-AVD_{Fat} ähneln dagegen denen von Patienten mit einer Wildtyp-YFV-Infektion (YFV_{Inf}).

Zytokinausschüttung von YEL-AEs

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GMCSF	GRO	GRO- α
B	Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GMCSF	GRO	GRO- α
C	IL-1 α	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
D	IL-1 α	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
E	IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTES
F	IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTES
G	TGF-β1	TNF- α	TNF-β	Blank	Blank	Blank	Neg	Pos
H	TGF-β1	TNF- α	TNF-β	Blank	Blank	Blank	Neg	Pos



	IL-6	IL-8	GRO	MIG	MCP-1	MCP-2	TGF- β 1	TNF- β	RANTES	GCSF, GMCSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13, IL-15, MCP-3, TNF- α
GB-03-06	-	+	+	-	+	-	+	+	++	-
BE-10-05	-	++	++	-	+++	++	-	-	++	-
ES-08-05	-	++	+	-	++	-	-	-	++	-
DE-07-05	-	+	+	+	++	-	+	+	++	-
ES-10-04	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+	+	+
ES-09-02	-	-	+	-	+	-	+	-	++	-
Vac1	-	-	+	-	++	-	+	+	+++	-
Vac5	-	-	+	-	-	-	-	+	++	-

Abbildung III.23: Zytokin-Profile von YFV-Geimpften und YEL-AE-Fälle. A: Verteilung der Zytokine auf dem Zytokin-Array (als Referenz für B). B: Zytokin-Array von einem fatalen (ES-10-04, 8 dpv), vier nichtfatalen YEL-AVD-Fällen (ES-08-05, 10 dpv; DE-07-05, 18 dpv; BE-10-05, 6 dpv; GB-03-06, 11 dpv) und Zytokin-Profil eines YEL-AND-Falles (ES-09-02, 12 dpv). C: Zytokine-Profil-Auswertung der in B genannten Fälle, zusätzlich zwei Zytokinprofile von Impfungen (Vac1, Vac5): +++: starke Reaktion, ++ moderate Reaktion, + schwache Reaktion.

Im Allgemeinen liegen die klinischen Werte von Impfungen ohne Komplikationen im Normbereich.

Um einen Einblick in die zelluläre Immunantwort zu erhalten, wurden die Zytokine der drei Gruppen (YEL-AVD_{Fat}, YEL-AVD, Impfinge) mit einem Human Zytokin-Antikörper Array bestimmt und miteinander verglichen. Dieser Array ist in der Lage 23 verschiedene Zytokine in einer Doppelbestimmung zu messen. Der Einsatz der Zytokin-Arrays bietet gegenüber der TaqMan-PCR auch positive und negative Kontrollen. So können mehrere Zytokine direkt detektiert werden gegenüber einer indirekten Bestimmung der Zytokin-kodierenden RNA. Die Anzahl der erfassten Zytokine ist außerdem größer (Abbildung III.23).

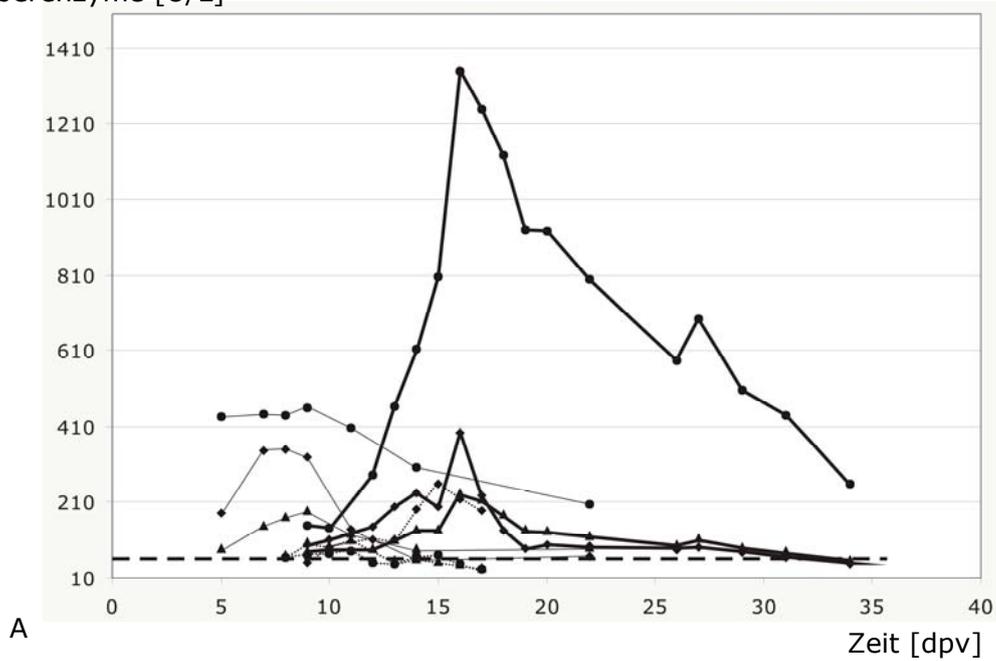
Bei dem YEL-AVD_{Fat} waren besonders die Zytokine GRO, IL-6, IL-8, MIG und MCP-1 stark erhöht im Gegensatz zu den restlichen Zytokinen, die eine deutlich geringere Signalstärke aufwiesen. IL-6, IL-8 und MCP-1 waren auch bei YFV_{Inf} sehr stark erhöht (Abbildung III.20). YFV_{Inf} als auch YEL-AVD_{Fat} zeigen nicht nur auf klinischer Ebene große Ähnlichkeit, sondern auch auf Zytokinebene.

Bei YEL-AVD-Fällen, bei denen sich die Patienten erholt hatten, wiesen die positiv getesteten Zytokine im Durchschnitt eine geringere Konzentration auf.

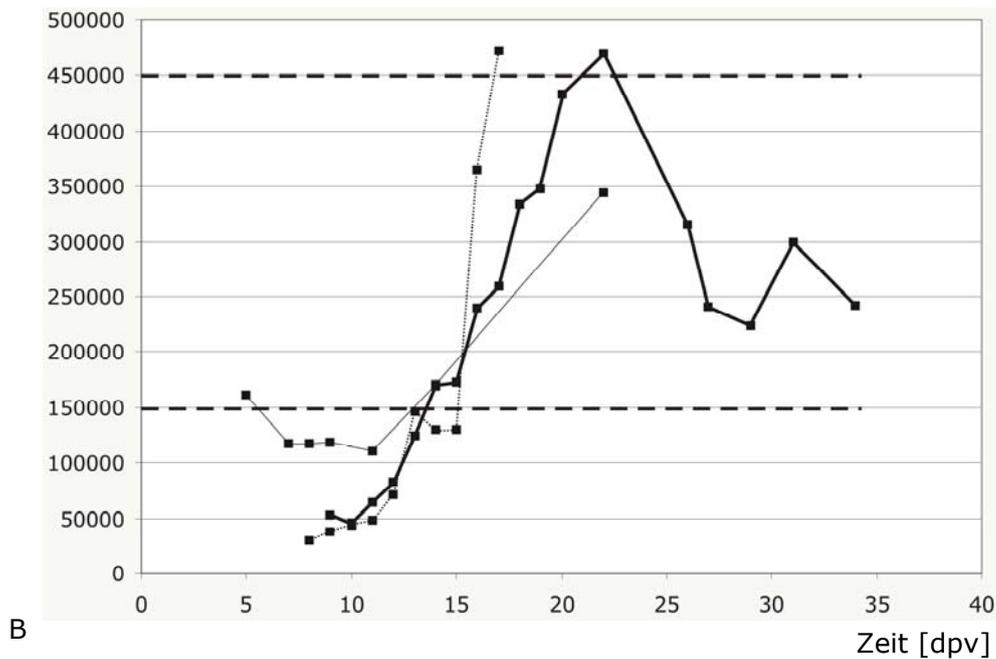
Impfinge ohne Komplikationen zeigten nur eine deutliche Reaktivität von RANTES und eine geringe Konzentration von TGF- β , TGF- β 1, MCP-1 und GRO.

Die Leberenzymwerte GOT, GPT und GGT nichtfataler YEL-AE-Fälle (BE-10-05, ES-08-05 and DE-07-05, Abbildung III.24A) sind zwar in geringerer Konzentration vorzufinden als bei Wildtypinfektionen, jedoch sind sie erhöhter im Vergleich zu gesunden Personen. Keine Erhöhung der GPT, GOT und GGT-Werte waren in dem YEL-AND-Fall vorzufinden. Die Thrombozytenzahl in nichtfatalen YEL-AVD-Fällen mit schwerem Verlauf waren kurz nach der Impfung (7-12 dpv) sehr niedrig (unter 100.000 Thrombozyten/ μ L) und stiegen rapide in der Erholungsphase wieder an (Abbildung III.24B). Dagegen zeigten weniger schwere YEL-AVD-Fälle zwar auch niedrige Thrombozytenwerte, aber noch mehr als 100.000 Thrombozyten/ μ L. Die Thrombozytenzahl des YEL-AND-Falles befand sich im normalen Referenzbereich (Daten nicht gezeigt).

Leberenzyme [U/L]



A

Thrombozyten [Zellen/ μ L]

B

Abbildung III.24: \blacklozenge GOT (1-38 U/L), \blacktriangle GPT (4-41 U/L) and \bullet GGT (1-66 U/L) von nichtfatalen YEL-AVD-Fällen (A), \blacksquare DE-07-05, \blacksquare BE-10-05, \cdots ES-08-05 Thrombozyten (150-450 Giga/ μ L) von nichtfatalen YEL-AVD-Fällen (B). Zahlen in Klammern geben den Referenzbereich an. Gestrichelte Linie in A gibt den maximalen Referenzwert an, Gestrichelte Linien in B geben den maximalen und minimalen Referenzwert an.

Impflinge und YFV_{Inf} wurden hinsichtlich ihrer zellulären Immunantwort unter besonderer Berücksichtigung der Zytokine betrachtet und mit den Zytokinen von YFV-impfassoziierter Gelbfieberfälle verglichen.

Dabei wurden auch unterschiedliche Untersuchungsmethoden verwendet, weil das Probenmaterial nur zu einigen Zeitpunkten der Infektion vorlag. Auf diese Art und Weise konnte das untersuchte Kollektiv um die Wildtypfälle und Impfzwischenfälle erweitert und die Datenbasis somit vergrößert werden, um erste Aussagen über die Immunantwort nach Infektion mit YFV treffen zu können.