

## V. Zusammenfassung

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.

Mit dieser Arbeit wurden wesentliche methodische Verbesserungen für zukünftige Studien der Immunantwort erarbeitet.

Mit der TaqMan-PCR ist eine Quantifizierung von YFV und von YFV-infektionsbedingter Genexpression in infizierten Proben (Serum, Gewebe) mit hoher Genauigkeit möglich. Als Referenzgenkandidaten wurden drei Gene ermittelt (L13, TBP und PPI), die in den YFV-relevanten Gewebe oder Zellen im Gegensatz zum bisherigen Referenzgen  $\beta$ -Aktin konstitutiv exprimiert werden.

Der Zytokin Array erlaubt im Vergleich zu allen anderen Methoden die kostengünstige, schnelle, umfassende und semiquantitative Bestimmung der Zytokine.

Der Primersatz zur Ermittlung der Sequenzen in den variablen Bereichen erlaubt die schnelle Charakterisierung der Virusstämme in mit oder ohne Komplikationen Geimpften, so dass Virusmutationen als Ursache für Komplikationen ausgeschlossen werden können.

Mit diesen etablierten und verbesserten Methoden wurden Gelbfiebervirus (YFV)-Infektionen nach Impfung und nach Wildtypinfektion näher untersucht. Aus der vergleichenden Analyse der Immunantwort von YFV-Wildtypinfizierten (YFV<sub>Inf</sub>), YFV-geimpften Personen (Impflinge) und YFV-Impfwischenfällen (YEL-AE) konnten so einige neue Erkenntnisse bezüglich der durch YFV induzierten Immunantwort gewonnen werden.

Die klinischen Daten, der Virustiter und die neutralisierenden Antikörper von YFV<sub>Inf</sub> und YEL-AEs zeigen, dass Personen mit YFV<sub>Inf</sub> und viszerotrope Impfwischenfälle (YEL-AVD) mit fatalem Ausgang (YEL-AVD<sub>Fat</sub>) ein sehr ähnliches Bild aufweisen und kaum voneinander zu unterscheiden sind. YEL-AEs mit nichtfatalem Ausgang schwanken in ihrer Manifestation. Eine Rückmutation des Impf- zum Wildtypvirus kann auf Grund der hier durchgeführten Sequenzanalysen als Ursache für YEL-AEs ausgeschlossen werden. Somit ist der Fokus weitergehender Untersuchungen auf die Wirtsfaktoren zu legen.

Als ein wirtsspezifischer Faktor wurde im weiteren Verlauf der Arbeit ein Teilaspekt der zellulären Immunantwort betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die

Aktivierung der Immunantwort durch die YFV-Infektion hinsichtlich der Zytokine sowohl in den Impfungen als auch in den YEL-AEs im Vergleich zu den YFV<sub>Inf</sub> deutlich geringer ausfällt. Die Anzahl der Zytokine und die Stärke der Zytokinausschüttung sind bei den YEL-AEs deutlich ausgeprägter als in den Impfungen und könnten mit dem Schweregrad der Nebenwirkungen zusammenhängen. Dabei könnten die Zytokine IL-6, IL-8, GRO, MIG, MCP-1, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\beta$  und RANTES eine große Rolle spielen. Bei dem YEL-AVD<sub>Fat</sub> waren die gleichen Zytokine (IL-6, IL-8 und MCP-1) stark erhöht, wie dies auch bei den YFV<sub>Inf</sub> der Fall ist. Außerdem konnten GRO und MIG in hohen Konzentrationen bei dem YEL-AVD<sub>Fat</sub> nachgewiesen werden. Personen ohne Impfbeschwerden zeigten in den Zytokinmessungen auf Proteinebene nur eine deutliche Reaktivität von RANTES, während andere Zytokine kaum oder gar nicht nachzuweisen waren.

Des Weiteren wurden drei Mutationsstellen im E-Protein des attenuierten YFV 17D untersucht, die im Verdacht stehen, für die Abschwächung des Gelbfiebertvirus (YFV) zu sorgen. Das E-Protein steht im Verdacht, für die Virulenz verantwortlich zu sein. Acht Aminosäuren des E-Proteins erscheinen besonders interessant. Drei der acht Aminosäuren wurden für anschließende Mutationsstudien verändert, um einen Aufschluss über die molekularen Determinanten der Attenuierung zu bekommen. Die Substitutionsmutanten pMutE52 und pMutE200 zeigten gegenüber dem Wildtyp und dem Impfstoffstamm eine ähnliche Replikationsfähigkeit, während pMutE299 nicht in Zellkultur replizieren konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Befunde, dass vor allem die zelluläre Immunantwort nach YFV-Infektion bzw. –Impfung deutliche diagnostische Hinweise über den Verlauf der Impfung bzw. Infektion ergeben. Die Immunantwort und die Erstinfektion von Körperzellen durch YFV bedarf dringend weiterer Untersuchungen, um klare Antworten auf die Erzeugung einer protektiven Immunantwort geben zu können. Ohne eine Antwort auf diese Frage ist eine Aufklärung der schweren Fälle von Nebenwirkungen bzw. Todesfällen nach YFV-Impfung nahezu unmöglich.

Um die Ursachen der Attenuierung der Impfstämme von YFV aufzuklären, sind weitere vergleichende Studien mittels reverser Genetik sowie auch alternative Methoden zur Messung der viralen Fitness (Replikationsfähigkeit, Infektiosität) notwendig, um den genauen molekularen Mechanismus der phänotypischen Effekte zu klären.