

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Bemerkung

1.1.1 Allgemeine Virologie

Schon im 18. Jahrhundert beobachtete Edward Jenner, dass Melkerinnen, die sich an harmlosen Kuhpocken infiziert hatten, bei auftretenden Pockenepidemien nicht oder kaum erkrankten. Er war der erste Arzt, der in der westlichen Welt experimentell nachwies, dass das intradermale Einbringen des Inhalts der Kuhpocken vor einer schweren Infektion mit echten Pocken schützen kann. Es ließ sich mit den damaligen Methoden jedoch kein pathogener Organismus nachweisen, weshalb man von einem Gift ausging [1].

Das einzige zu Beginn des 20. Jahrhunderts bekannte Charakteristikum von Viren war ihre Ultrafiltrierbarkeit. Die ersten Anstrengungen Viren zu klassifizieren basierten auf beobachteten gemeinsamen pathogenen Eigenschaften, so z.B. Organotropismus, bestimmte Übertragungswege und gemeinsames Erregerreservoir. Die Entdeckung neuer Viren nahm ab 1950 durch Einführung von Zellkulturtechniken explosionsartig zu und führte dazu, dass viele Institutionen unabhängig voneinander Klassifikationsschemata entwickelten.

Ein weiterer wesentlicher technischer Fortschritt war die Entwicklung der Elektronenmikroskopie, die Brenner und Horne eine rasche morphologische Charakterisierung von Viren ermöglichte [2].

1.1.2 Paramyxoviridae

Die Familie der Paramyxoviridae umfasst eine Reihe wichtiger humanpathogener Viren. Zu ihnen zählen u.a. das Respiratorische Synzytialvirus, die Parainfluenzaviren, das Mumpsvirus und das Masernvirus. Die Familie der Paramyxoviren wird in zwei große Subfamilien unterteilt, die Paramyxovirinae und die Pneumovirinae.

Die Paramyxovirinae unterteilen sich in die fünf Genera Avullavirus, Henipavirus, Respirivirus, Rubulavirus und Morbillivirus. Die Pneumovirinae unterteilen sich in die zwei Genera Pneumovirus und Metapneumovirus. Diese Unterteilung basiert auf morphologischen Kriterien, der Organisation des Genoms, der Aktivität der Proteine und der Gensequenz. Die

Einleitung

Klassifizierung einer Reihe von neu entdeckten Paramyxoviren, so z.B. des Tupaia-Paramyxovirus, des Beilong Virus und des J-Virus ist noch nicht abgeschlossen.

Die gemeinsamen Strukturmerkmale der Paramyxoviridae sind die Virushülle und das einzelsträngige, nicht-segmentierte Ribonukleinsäure (RNS)-Genom, das für sechs bis zehn Strukturproteine kodiert. Die Strukturproteine sind für die Virusadsorption, Penetration, Replikation und Freisetzung verantwortlich.

1.1.3 Morphologie der Parainfluenzaviren

Parainfluenzaviren besitzen eine doppelschichtige Lipidmembran, auch Hülle genannt, die bei der Knospung der Viren von der Wirtsmembran abgeschnürt wird. In die Lipidmembran sind die Oberflächenproteine, also das Fusions-Protein (F) und Hämagglutinin-Neuaminidase Protein (HN) eingebettet. Zwischen der Hülle und dem Nukleokapsid spannt sich das Matrix-Protein (M), das für die Morphogenese des Virus verantwortlich ist. Das Nukleokapsidprotein (N) formt mit dem RNS-Genom den Nukleokapsidkomplex, an dem die RNS-abhängige RNS-Polymerase (L) mit dem Phosphoprotein (P) als Cofaktor angeheftet sind und zusammen den Ribonukleoproteinkomplex (RNP) bilden. Der helikale RNP im Zentrum des Virus ist also ein Komplex aus RNS-Genom, N-, P- und L-Proteinen. Dabei dissoziiert das N-Protein bei der Transkription nicht, sondern die Helix wird in dem Bereich, an den die Polymerase bindet, entwunden, sodass sie dort transkribieren kann [3]. Nach der Transkription windet sich der RNS-N-Protein-Komplex wieder zusammen. Der RNP kann in vitro mRNA transkribieren und das Genom replizieren, ist also die minimale Einheit, mit der eine Infektion stattfinden kann.

1.1.4 Das virale Genom und die Proteine

Das virale Genom besitzt an beiden Enden eine nicht kodierende Region, bestehend aus ca. 50 Nukleotiden am 3' Ende und aus 50-161 Nukleotiden am 5' Ende. Diese Regionen sind essenziell für Transkription und Replikation, d.h. sie kodieren am 3' Ende Promotoren für Replikation und Transkription des Genoms und am 5' Ende den Promotor für die Replikation des (+) Strang Antigenoms. Am Anfang und Ende jedes Gens befinden sich transkriptionelle Kontrollsequenzen, sogenannte Genstart- und Genendsequenzen. Zwischen den Genen befinden sich intergenische Segmente, die bei dem humanen Parainfluenzavirus Typ 3 (HPIV3) nur aus drei Nukleotiden bestehen. Es wird davon ausgegangen, dass der virale Polymerasekomplex am Ende jeder Geneinheit vom Genom dissoziiert oder zumindest die Transkriptaseaktivität einstellt

Einleitung

und dann am Genstart des nächsten Gens wieder die Transkription initiiert [4]. Als Beispiel sei in Abbildung 1 die genomische Organisation des HPIV3 dargestellt.

Abb.1: Organisation des HPIV3 Genoms (schematisch)

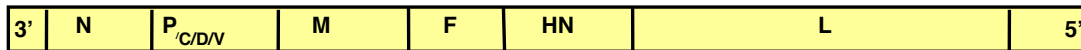


Abb.1 N: Nukleoprotein; P: Phosphoprotein; M:Matrix-Protein; F:Fusions-Protein; HN:Hämagglutinin-Neuraminidase Protein; L:Large-Protein

1.1.4.1 Das Nukleokapsidprotein

Das Nukleokapsidprotein (N) bildet mit der RNS das helikale Nukleokapsid. Das N-Protein hat zwei Domänen, die unterschiedliche Aufgaben in Replikation und Transkription übernehmen. Die gut konservierte, globuläre, ca. 80% des Proteins ausmachende N-terminale Domäne ist für die RNS-Bindung verantwortlich. Außerdem ist es für die helikale Struktur des Holonukleokapsids verantwortlich [5]. Die C-terminale Domäne, 20% des Proteins, ist sehr variabel. Sie vermittelt, zumindest bei murinem PIV1, die Bindung zum Phosphoprotein.

Während des Replikationszyklusses schützt das Nukleokapsidprotein die genomische RNS vor Abbau durch RNAsen [6]. Außerdem ist die C-terminale Domäne für die Replikation des Genoms unerlässlich, da Deletionsanalysen gezeigt haben, dass ein Fehlen der C-terminalen Domäne eine Amplifikation des Genoms verhinderte [7].

1.1.4.2 Das P-Gen und seine Genprodukte

Das P-Gen kodiert für eine Reihe von Proteinen, von denen das P-Protein die wichtigste Aufgabe in der viralen RNS-Synthese, der Verpackung des Genomes und der mRNS-Synthese übernimmt. Die wesentlichen Domänen werden durch die P-Carboxy Region repräsentiert, die für die Genus Morbillivirus, Respirivirus und Newcastle Disease Virus (NDV) transkribiert wird. Damit befindet sich in der P-Carboxy Region das Polymerase Cofaktor Modul, das für die Interaktion mit der Polymerase verantwortlich ist.

Einleitung

Hierbei benötigt die L-Polymerase das Phosphoprotein, um an den N:RNS –Komplex zu binden. Auch bei der Transkription funktioniert die L-Polymerase ohne das P-Protein nicht [8, 9]. Bis auf einige Nukleotide im N-terminalen Bereich des P-Gens, das für die Nukleokapsid-Umhüllung während der Replikation verantwortlich ist, ist der Rest des Gens im N-terminalen Bereich für die Replikation entbehrlich. Jedoch spielen die in diesem Bereich translatierten akzessorischen Proteine (P, C, V) in der Regulation der RNS-Synthese und der Wirtszellabwehr i.S. einer Interferonantagonisierung eine wichtige Rolle [10].

1.1.4.3 Das Matrix-Protein

Das Matrix-Protein (M) ist das am meisten vorhandene Protein des Virus. Das Parainfluenzavirus 3 M-Gen hat eine Länge von 1150 Nukleotiden und wird zu 353 Aminosäuren translatiert [11]. Es hat einen amphiphilen Charakter und assoziiert mit der Membran. Elektronenmikroskopische Analysen haben gezeigt, dass sich der Reifungsprozess der Viren in zwei verschiedene Stadien untergliedern lässt. Man sieht im Vorstadium der Knospung der neuen Viren den Nukleokapsidprotein-Komplex linear der Wirtszellmembran, in die schon die Glykoproteine des Virus eingebaut wurden, anliegen. Dabei vermittelt das M die Haftung zwischen Plasmamembran und Nukleokapsidprotein-Komplex genau an den Stellen an den die Plasmamembran mit den viralen Proteinen besetzt ist, indem es mit dem zytoplasmatischen Schwanz dieser Glykoproteine interagiert [12]. Das Zweite Stadium bildet die Knospung. Das M-Protein hat nicht nur im Reifungsprozess eine bedeutende Rolle. Auch in der viralen Morphogenese ist das M-Protein das entscheidende Leitprotein [13].

1.1.4.4 Das Fusions-Protein

Das Fusions-Protein (F) ist das virale Glykoprotein, das die Verschmelzung der viralen Hülle mit der Wirtszellmembran katalysiert. Dies ist die Voraussetzung für den Transfer des Genoms in die Zielzelle. Das Protein, das als inaktive Vorstufe (F_0) synthetisiert wird und durch eine Wirtsprotease aktiviert wird, bildet in der Virushülle Homotrimere. Die N-Terminale (F_2) und C-Terminale Untereinheit (F_1) sind über eine Disulfidbindung miteinander verbunden [14].

Die F_1 Untereinheit ist in der viralen Hülle durch eine C-terminale Transmembrandomäne verankert, während die N-terminalen 25-35 überwiegend apolaren Aminosäuren das sogenannte Fusionspeptid bilden. Dieses Fusionspeptid spielt im Fusionsprozeß eine entscheidende Rolle,

Einleitung

das es durch Insertion in die Wirtszellmembran diese destabilisiert und eine Mischung der viralen und zellulären Membranlipide ermöglicht. Weiterhin befinden sich zwischen dem Fusionspeptid und der TM-Domäne zwei Regionen mit sich vier zu drei wiederholenden hydrophoben Aminosäuren (*heptad repeats*), die für die Funktion des F wichtig sind [15].

Abb.2 Das virale Fusionsprotein

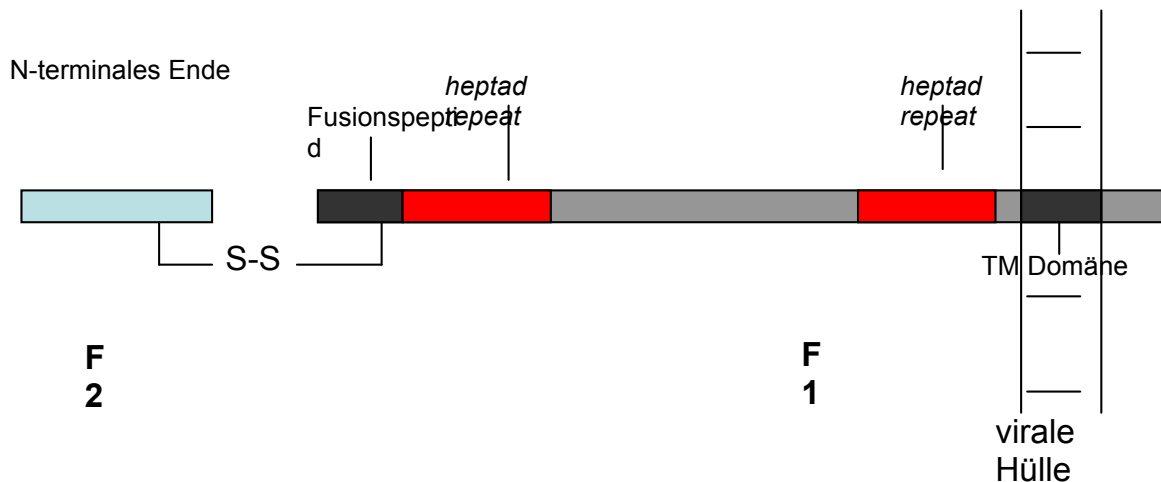


Abb.2 Das virale Fusionsprotein besteht aus zwei Untereinheiten (F1 und F2). F1 besitzt eine C-terminale Transmembrandomäne. Am N-terminalen Ende befindet sich das Fusionspeptid. Zwischen Fusionspeptid und TM-Domäne befinden sich zwei Regionen, die *heptad repeats* beinhalten.

Die F-Proteine der Paramyxoviren gehören, wie die der Retroviren, Coronaviren, und Filoviren zu den viralen Fusionsproteinen der Klasse I. Die ersten Modelle für diese Klasse von Fusionsproteinen konnten anhand von Strukturanalysen für das Hämagglutininprotein des Influenzavirus gemacht werden [16]. Im Allgemeinen folgen die Klasse I Fusionsproteine alle einem Paradigma. Drei Polypeptidketten vereinen sich zu einem Homotrimer. Für die Ausbildung dieser Tertiär- und Quarternärstruktur spielen Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Kohlenwasserstoffseitenketten zwischen den Polypeptidketten eine wichtige Rolle. Nach proteolytischer Spaltung von F0 und Aktivierung des Fusionsproteins wird das hydrophobe Fusionspeptid freigesetzt, das die Zellmembran destabilisiert und zur Verschmelzung von Virus- und Zellmembran beiträgt. Kristallographische Analysen haben gezeigt, dass die *heptad repeats* helikale Haarnadelstrukturen ausbilden, um den energieärmsten Zustand einzunehmen. Dabei bilden die sich N-terminal befindenden trimere *heptad repeats* den Kern, an den sich

Einleitung

antiparallel die C-terminal befindenden trimeren *heptad repeats* anlagern und so die Verschmelzung der Membran bewirken [17]. Das F ist von besonderer immunologischer Bedeutung, da es neben dem Hämagglutinin-Neuraminidase Protein das zweite wichtige neutralisierende Antikörper induzierende Glykoprotein darstellt.

1.1.4.5 Das Hämagglutinin-Neuraminidase Protein

Das Hämagglutinin-Neuraminidase Protein (HN) ist das zweite Glykoprotein in der Virushülle. Es induziert wie das F-Protein neutralisierende Antikörper. Es hat drei Funktionen: erstens vermittelt es die Bindung des Virus zum Rezeptor auf Zellmembranen. HN bindet an sialinsäurehaltigen Rezeptoren, die auf fast allen Zelloberflächen exprimiert werden. Dies erklärt auch die hämagglutinierende Eigenschaft der PIV3. Zweitens besitzt HN Neuraminidaseaktivität, d.h. das Protein kann Sialinsäuren abspalten. Diese Aktivität verhindert das Verklumpen der Viren untereinander und hilft bei der Knospung der Viren von der Wirtszelloberfläche. Drittens besitzt das HN eine F-Protein aktivierende Funktion [18]. Ob das Protein ein oder zwei aktive Zentren für die Hämagglutination und Neuraminidaseaktivität besitzt, wird kontrovers diskutiert und ist eventuell von Virusspezies zu Virusspezies unterschiedlich [19].

1.1.4.6 Das Large-Protein

Das Large-Protein Gen ist das am weitesten vom Promotor entfernte Gen und kodiert für ein ca. 2200 Aminosäuren langes Polymeraseprotein. Das L-Protein bindet an den RNS:N-Komplex durch das P-Protein und fungiert als RNS abhängige RNS Polymerase sowohl für die Replikation als auch für die Transkription [20, 21]. Dabei entsteht in der Replikation das von N-Protein umhüllte Antigenom, das als Matrize für die Genomsynthese in gleicher Weise dient. Während der Transkription entsteht am 5`Ende eine Kappenstruktur durch Anhängen methylierter Guanosinbasen an die mRNS und ein am 3`Ende polyadenylierter Schwanzteil, der wahrscheinlich aufgrund eines Stotterns der Polymerase im Bereich des an Uridylresten reichen Genendsequenz zustande kommt.

1.1.5 Natürlicher Infektionszyklus

Für die Bindung des Virus an die Zielzellmembran ist das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein verantwortlich. Die Bindung kann ebenfalls durch das gleiche Enzym durch

Einleitung

Polysaccharid-Spaltung gelöst werden. Der Rezeptor für das HN ist die N-Acetylneuraminsäure, die als Oberflächenkomponente an Lipiden (Ganglioside oder N-Acetylglykolipide) und Glykoproteinen gefunden wird [22]. Nach Bindung des Virus wird die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran durch das F vermittelt. Dadurch gelangt das RNP in das Zytoplasma. Die weiteren Schritte der Transkription und Replikation laufen im Zytoplasma ab.

Im RNP ist die genomische RNS durch das Nukleoprotein umhüllt. Dieses Protein ist an eine RNS-abhängige RNS-Polymerase (L-Protein) gebunden, die wiederum einen Co-Faktor, das P bindet. Nach Infektion einer Zelle dient der RNP als Vorlage für zwei Syntheseschritte. Zum einen für die hintereinander mit absteigender Menge produzierten mRNS's und zum anderen für die des Antigenoms, das wiederum als Matrize für die Synthese der Tochtergenome dient. Die Transkription beginnt an einem Promoter am 3'-Ende.

Die Polymerase beginnt zuerst mit der Transkription der „*Leader RNS*“ bevor sie mit der mRNS-Synthese, angefangen mit dem N Genstartsignal, beginnt. Damit die Polymerase effizient arbeitet, muß die Genomlänge einem Mehrfachen von 6 entsprechen. Dies ist als „*Rule of Six*“ oder Sechserregel bekannt [23]. Diese Regel steht mit hoher Wahrscheinlichkeit mit der Tatsache in Verbindung, dass genau sechs Nukleotide jedes N umhüllen und dies Voraussetzung für eine optimale Interaktion mit L und P ist [24]. Die Umhüllung von N beginnt mit den ersten Nukleotiden, die synthetisiert werden am 5'-Ende der wachenden RNS-Kette und wird bis zum Ende fortgeführt. Die Effizienz des 3'-End Promoters ist dann von der Lage cis-agierenden Sequenzen im Verhältnis zu N abhängig.

Nach Initiation der N-mRNS durch ein Genstartsignal mit Bildung einer Cap-Struktur am 5'-Ende durch die Polymerase, jedoch ohne Umhüllung durch das N-Protein, wird die mRNS am 3'-Ende mit einem Polyadenylierungssignal ausgestattet. Die nachgelagerten mRNS's beginnen ebenfalls mit einem Genstartsignal, das durch einen intergenischen Bereich von drei Nukleotiden (3'GAA) vom Genendsignal der vorangehenden mRNS getrennt sind. Die Reinitiation der nächsten mRNS findet nicht zwangsmäßig statt, da sich die Polymerase gegentlich löst. Dadurch werden promotorproximale Gene besser transkribiert als promotordistale Gene, sodass ein mRNS Gradient entsteht.

Nach Translation der primären Transkripte und der Akkumulation der viralen Proteine beginnt die Synthese des Antigenoms durch die gleiche Polymerase, die jetzt die gesamte RNS ohne Unterbrechung liest. Auch das gesamte Antigenom umhüllt jetzt N-Proteine. Die dann folgende Replikation des Genoms ist, wie bei der Synthese des Antigenoms, abhängig von der Anzahl freier N. Nach Synthese der Tochter RNP kommt es zur Virionmorphogenese durch das Zusammenspiel der viralen Proteine, insbesondere auch des M, mit zellulären Proteinen wie z.B.

Alix und anderen Zytoskelettproteinen [25]. Die in die Lipidmembran der Zelle befindlichen viralen Glycoproteine werden durch die Knospung des Virions von der Zellmembran Bestandteil der Virushülle. Das M vermittelt die Haftung zwischen Plasmamembran und Nukleokapsidprotein-Komplex genau an den Stellen an den die Plasmamembran mit den viralen Proteinen besetzt ist [12]. Schließlich kommt es zur Knospung, bei der das M das entscheidende Leitprotein darstellt [13].

1.2 Impfstoffe gegen humane PIV

1.2.1 Klinische Bedeutung des humanen Parainfluenza Virus (HPIV)

Die Parainfluenza Viren Typ 1,2 und 3 sind nach dem Respiratorischen Synzytial Virus (RSV) die häufigsten Gründe für schwere Atemwegserkrankungen von Säuglingen und Kleinkindern [26]. Das HPIV3 verursacht wie das RSV Bronchiolitiden und Pneumonien vorwiegend in den ersten beiden Lebensjahren [27]. Bis zum Alter von zwei Jahren sind ca. 60 % der Kinder wenigstens einmal mit HPIV3 infiziert. Infektionen mit HPIV1 und 2 verursachen sowohl obere Atemwegserkrankungen als auch stenosierende, subglottische Laryngotracheitis (Pseudokrupp). Otitis media ist eine häufige Komplikation im Anschluss an HPIV Erkrankungen. Mit fünf Jahren sind die meisten Kinder wenigstens einmal mit diesen Viren infiziert worden. In immunsupprimierte Patienten kann HPIV tödlich verlaufende systemische Erkrankungen hervorrufen. Das saisonale Auftreten unterscheidet sich bei HPIV1, 2 und 3. Während HPIV1 und HPIV2 alle zwei Jahre Epidemien verursachen, kommt HPIV3 jährlich im Frühling und Sommer gehäuft vor. Auf Grund der Erkrankungshäufigkeit und –schwere, mit vielen Tausend Krankenhausbehandlungen pro Jahr alleine in Deutschland, wird seit längerem an der Entwicklung von HPIV Impfstoffen gearbeitet.

1.2.2 Vorarbeiten mit inaktivierten Impfstoffen

Viele Impfstrategien wurden entwickelt, jedoch ist bis heute kein Impfstoff gegen HPIV verfügbar. Es soll hier nur auf die inaktivierten Vakzinen eingegangen werden, da sie erheblich dazu beigetragen haben, die Immunpathologie besser zu verstehen. Immunität gegen RSV oder HPIV wird durch humorale und zelluläre Faktoren vermittelt, was durch Serumantikörper aus dem mütterlichen Nestschutz, sekretorische Antikörper und zytotoxische T-Lymphozyten realisiert wird. Während Antikörper die Viren direkt neutralisieren können und Langzeitschutz bieten, trägt die zelluläre Immunantwort zur Resolution der Primärinfektion bei [28]. Für

Einleitung

Neugeborene und Säuglinge ist die Immunantwort auf Grund der Unreife des Immunsystems und der Suppression durch maternale Antikörper nur unzureichend.

Der erste experimentelle RSV-Impfstoff wurde 1960 durch Formalin-Inaktivierung (FI) von RSV hergestellt. Dieser Impfstoff hatte nicht den gewünschten Effekt, sondern exazerbierte die Krankheit bei Reinfektion mit RSV [29, 30]. Drei Faktoren trugen zu dieser Aggravierung bei. Erstens induzierte FI hohe Antikörper-Titer gegen das F Glykoprotein, jedoch hatten diese Antikörper nur geringe neutralisierende Aktivität [31]. Zweitens ist anzunehmen, dass nicht genügend IgA-Antikörper in den Respirationstrakt sezerniert wurden, da FI parenteral verabreicht wurde. Drittens wurden zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen nicht, $CD4^+$ T-Zellen jedoch stark induziert [32]. Aufgrund dieser Konstellation waren der Replikation keine Hindernisse gesetzt. Die Replikation war sodann der Stimulus für eine überschüssige Entzündungsreaktion, die die Erkrankung aggravierte. Der dritte Faktor, der zu dieser Verschärfung beitrug, war die oben erwähnte starke Induktion der $CD4^+$ T-Zellen. Die Art der Helferzellen wird durch den Typ des Stimulus, Lebendviren oder FI Impfstoff, determiniert. Dabei induziert FI eine Zytokinausschüttung, die auf eine Th2-Antwort hindeutet [33].

Die schwere Bronchiolitis, die nach FI-Immunisierung und Reinfektion vorlag, war Folge einer verstärkten $CD4^+$ T-Helferzellen abhängigen Infiltration von inflammatorischen Zellen, die auf ein schon durch den zytopathischen Effekt des Virus geschädigtes Epithel trafen.

1.2.3 Lebendimpfstoffe gegen HPIV3

Attenuierte Lebendimpfstoffe haben gegenüber Totimpfstoffen viele Vorteile. Sie induzieren bei intranasaler Immunisierung sowohl eine systemische als auch eine lokale Immunität. Die Art der Reaktion ähnelt stark der natürlichen Infektion, induziert jedoch keine Krankheitssymptome, da das Virus attenuiert ist. Die attenuierten Lebendimpfstoffe replizieren auch in der Gegenwart mütterlicher Serumantikörper, was für die Immunisierung von Säuglingen von entscheidender Bedeutung ist. Eine gute Balance zwischen Immunogenität und Virulenz ist jedoch nur sehr schwer zu finden, da die Replikation des attenuierten Lebendimpfstoffs sowohl mit der Immunogenität als auch der Induktion klinischer Symptome korreliert [34].

Um Langzeitschutz gegen HPIV3 Erkrankungen zu induzieren, sind wahrscheinlich zwei oder drei intranasale Impfungen notwendig. Die adäquate Restriktion der Impfvirusreplikation ist das eigentliche Ziel der Attenuierung von Lebendimpfstoffen, jedoch muss das Impfvirus ausreichend gut replizieren, um eine robuste Immunantwort zu erzeugen. Bisher sind zwei

Einleitung

biologisch hergestellte HPIV3 Impfkandidaten in klinischen Studien in seronegativen Säuglingen evaluiert worden. Das attenuierte HPIV3-cp45 (cp45) stammt vom JS Stamm des HPIV3 ab, und wurde durch 45 Pasagen in primären Affennierenzellen bei niedrigen Temperaturen (cold passage 45) hergestellt. Kennzeichnend sind drei Eigenschaften, die dieses Virus durch das Passagieren erworben hat. Das Virus ist (1) kälteadaptiert, sodass es auch bei 20°C effizient repliziert, es ist (2) temperatursensibel, d.h. es ist in der Replikation bei 39°C restringiert und es ist (3) im Respirationstrakt von Primaten und Menschen attenuiert. Das cp45 Virus besitzt 20 Punktmutationen im Vergleich zum JS Wildtyp.

In einer mehrstufigen Phase I Studie wurde die Sicherheit und Immunogenität von cp45 in Erwachsenen, HPIV3-seropositiven Kindern, HPIV3-seronegative Kindern und in vier bis acht Wochen alten Säuglingen evaluiert [35, 36]. Die Säuglinge bekamen zwei Dosen in zwei unterschiedlichen Intervallen (ein bzw. drei Monate). Der Impfstoff war überattenuiert und kaum infektiös für Erwachsene und für seropositive Kinder jedoch infizierte er 94 % der seronegativen Säuglinge und Kinder. In Säuglingen war der Impfstoff immunogen, phänotypisch stabil, und wurde gut toleriert. Im Gegensatz zu den seronegativen Kindern konnte ein ≥ 4 -facher Anstieg IgG Antikörpertiter nur wenigen Säuglingen beobachtet werden. Ein Anstieg der IgA Antwort auf HN konnte jedoch in allen seronegativen Säuglingen und Kindern beobachtet werden. Die Höhe des mittleren IgA Titers war für seronegative Säuglinge trotz zweiter Impfung niedriger als nach einfacher natürlicher Infektion mit dem Wildtypvirus. Dies zeigt, dass Säuglinge zwei oder mehr Impfungen brauchen, um ausreichend geschützt zu werden.

Die Untersuchung der Unterschiede in den Intervallen zur Zweitimpfung zeigte zwei wichtige Erkenntnisse. Zum einen zeigte sich, dass die Zweitimmunisierung nach drei Monaten häufiger zur Infektion mit robuster Replikation führt als die Impfung nach einem Monat, was ein Hinweis sein kann auf die Abnahme der Immunantwort nach drei Monaten. Zum anderen kam es nach Zweitimpfung nach drei Monaten häufiger zu einem 4-fachen Anstieg des IgA Titers. Diese Daten zeigten, dass eine Einfachimpfung mit cp45 eine kurze lokale Immunität in Säuglingen erzeugt und dass eine optimale Immunogenität mit mehreren Dosen im Intervall größer als einen Monat jedoch geringer als drei Monate für die Zweitimpfung erzielt werden könnte [35, 36].

In einer Phase II Studie, in der 226 seronegative Säuglingen und Kinder evaluiert wurden, war cp45 sicher, adäquat attenuiert und hochimmunogen. Vierundachtzig Prozent der seronegativen Impflinge entwickelten einen Antikörperanstieg um mehr als das Vierfache [37].

Der zweite experimentelle HPIV3 Impfstoff, das bovine PIV3 (BPIV3), ist ein mit HPIV3 eng verwandtes Virus, das für Rinder virulent ist, aber im Menschen nur eingeschränkt repliziert.

Einleitung

Vergleiche zwischen BPIV3 und HPIV3 haben gezeigt, dass die Aminosäuresequenz der HN- und F-Proteine zu 79% bzw 75% konserviert ist [38]. In einer Phase I-Studie konnte gezeigt werden, dass BPIV-3 von Säuglingen und seronegativen Kindern im Alter von 2-36 Monaten gut toleriert wird, sehr infektiös, phenotypisch stabil und immunogen ist. Das geometrische Mittel des Antikörpertiters im Hämagglutinationsinhibitionstests (HAI) aber war für HPIV3 circa vierfach niedriger als für BPIV3. In einer Phase II-Studie wurden 192 gesunde zwei Monate alte Säuglinge durch Gabe von 10^5 50% *tissue culture infective dose* ($TCID_{50}$), 10^6 $TCID_{50}$ oder Placebo im Alter von 2, 4, 6, und 12 bis 15 Monaten evaluiert. Auch hier wurde der Impfstoff, mit Ausnahme einer Häufung von Fieber nach der zweiten Impfung, gut toleriert und es gab keine signifikanten Unterschiede im Auftreten von Nebenwirkungen [39, 40]. Dennoch sind die antigenischen Unterschiede zwischen HPIV3 und BPIV3 Grund zur Sorge im Hinblick auf ausreichende Immunogenität.

Sowohl cp45 als auch BPIV3 sind als rekombinante (cDNS generierte) Impfstoffe regeneriert worden. Die rekombinante DNS Technologie hat einen raschen Fortschritt in der Entwicklung mehrerer Impfstoffkandidaten für HPIV3 sowie in der Generierung chimärer bovin-humaner PIV3 (B/HPIV3) ermöglicht [41, 42]. B/HPIV3 basiert auf der Sequenz von BPIV3, jedoch sind die Glykoproteingene F und HN durch die HPIV3 Glykoproteingene ersetzt. Das BPIV3 ist ein im Menschen attenuiertes Virus, das zwar das Atemwegsepithel infizieren kann, aber nur eingeschränkt repliziert und keine Krankheit induziert [40]. B/HPIV3 ist, ähnlich dem BPIV3, ein in Primaten attenuiertes Virus, ist jedoch gegenüber HPIV3 besser immunogen, da es die HPIV3 Glykoproteingene anstelle der BPIV3 Gene exprimiert. B/HPIV3 befindet sich derzeit in der Phase 1 der klinischen Prüfung in seronegativen Kleinkindern. Die Attenuierung von B/HPIV3 basiert auf zahlreichen wirtsspezifischen Sequenzunterschieden in allen BPIV3 Genen und ist ausführlich evaluiert [43]. Das B/HPIV3 repliziert etwas besser als BPIV3 aber ist dennoch gegenüber HPIV3 attenuiert. Die Beobachtung, dass das Einfügen von F und HN zu einem Anstieg in der Replikation im Vergleich zu BPIV3 geführt hat, legt nahe, dass BPIV3 F und HN neben anderen Genen zur Restriktion beigetragen hat. Neben der Restriktion hat das B/HPIV3 noch die wichtige Eigenschaft die hauptprotektiven Antigene F und HN des humanen HPIV3 zu besitzen, die es zu einem interessanten Impfstoffkandidaten macht [41, 43].

1.3 Reverse Genetik

Reverse Genetik der Viren beschreibt den Ansatz, den Genotyp eines Virus so zu verändern, dass ein Virus mit dem gewünschten Phänotyp von einer komplementären cDNS generiert werden kann. Der Ausgangspunkt ist hier die gezielte Mutation der das virale Genom kodierenden cDNS. Aus der modernen Virologie sind reverse Genetiksysteme nicht mehr wegzudenken, da sie erheblich zur Erforschung der Funktion der Viren und zur Impfstoffentwicklung beigetragen haben. Das erste reverse Genetiksystem für ein Virus der Mononegavirales wurde 1994 beschrieben [44]. Im Gegensatz zu positiv-Strang RNS-Viren oder DNS-Viren kann das virale Genom (Minusstrang RNS) alleine keine Infektion auslösen, da eukaryotische Zellen keine RNS-abhängige RNS Polymerase exprimieren [45]. Das System basiert auf der simultanen intrazellulären Transkription der viralen genomischen RNS und der Expression der viralen Proteine, die für die Replikation und Transkription notwendig sind. Das erste System beinhaltete die Infektion von Zellen mit einem rekombinanten modifizierten Vaccinia Virus Ankara (MVA-T7), das die RNS-abhängige RNS Polymerase des Bakteriophagen T7 exprimierte, und die Transfektion derselben Zellen mit vier Expressionsplasmiden für N, P und L sowie für das virale Genom, die T7 Promotoren und T7 Terminatorsequenzen besitzen. Das MVA-T7 kann sich nicht produktiv in Primatenzelllinien vermehren, jedoch ist die virale Genexpression unbeeinträchtigt, was das MVA-T7 zu einem effizienten und sicheren Vektor macht. MVA hat den Vorteil ausschließlich im Zytosol eine robuste RNA Synthese zu ermöglichen. Weiterhin konnte das Transfizieren von linearisierten Plasmiden durch Einbringen der Ribozymsequenz des Hepatitis Delta Virus in die Expressionsplasmide umgangen werden, sodass korrekte 3'-Enden entstanden (Rule of Six), was für die virale Polymerase wesentlich ist [46].

Der erste erfolgreiche Versuch, ein vollständiges Virus, das Tollwutvirus, aus cDNS zu synthetisieren, gelang nach mehrjährigen Minigenomversuchen 1994. Der Zugang zum Erfolg beinhaltete die intrazelluläre Expression der Rabies Virus N-, P-, und L-Proteine zusätzlich zur gesamten RNS. Dieses RNS-Transkript war in antigenomischer Richtung ausgerichtet (positiv Strang), was als entscheidender Schritt zur erfolgreichen Generierung des Virus beitrug. Es konnte damit das bis dahin stattfindende Hybridisieren der mRNA umgangen werden und ermöglichte die Verpackung des Antigenoms in das RNP durch die mittransfizierten Plasmide. Dies führte nach RNP Bildung zur Replikation des Genoms, das ebenfalls als RNP synthetisiert wurde. Nun konnte ausgehend vom negativ Strang RNP ein regulärer Infektionszyklus stattfinden [44].

1.4 Impfstoffe und Immunmodulation

Die Immunmodulation experimenteller Impfstoffe durch Einbringen von Zytokingenen in das virale Genom des Impfstoffes ist ein neuer Ansatz in der Impfstoffentwicklung. Bislang wurden Immunmodulatoren wie z.B. Adjuvantien hauptsächlich bei Totimpfstoffen verwendet und als externe Substanz den Impfantigenen beigemischt. Die Immunantwort auf mukosale Lebendimpfstoffe ist sowohl lokal als auch systemisch, stimuliert das angeborene wie auch das adaptive Immunsystem und löst sowohl humorale als auch die zelluläre Reaktionen aus. Die Stärke der Immunantwort hängt dabei wesentlich von der Menge der exprimierten Antigene, also von der Replikation des Lebendimpfstoffs, ab. Neutralisierende Antikörper haben einen entscheidenden Einfluss auf den Langzeitschutz gegenüber akuten viralen Infektionen mit Paramyxoviren. Ein Beispiel bietet dafür der Nestschutz der Säuglinge, der durch transplazentare Übertragung mütterlicher IgG Antikörper zum Kind Schutz vor akuten viralen Infektionen in den ersten Lebensmonaten bietet.

Ein erster Versuch die Immunantwort eines Lebendimpfstoffs zu erhöhen, ohne dessen Virulenz zu steigern, bestand in der Expression des Granulozyten-Makrophagen Kolonie Stimulierenden Faktors (GM-CSF), von einem zusätzlichen Gen, das in B/HPIV3 eingebracht wurde [47]. B/HPIV3-GMCSF induzierte trotz einer 40-fach reduzierten Replikation im oberen Respirationstrakt einen sechsfach höheren Antikörpertiter als B/HPIV3. Darüber hinaus war die Frequenz der virusspezifischen Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) produzierender T-Zellen im GM-CSF exprimierenden Virus deutlich höher als im Vergleichsvirus; es konnte also gezeigt werden, dass das Zytokinmilieu stark dazu beitragen kann, die Immunogenität experimenteller Impfstoffe zu verbessern [47].

1.5 Das Interferon γ induzierbare Protein 10 (IP10)

Die Induktion inflammatorischer Zytokine in Folge von viralen Atemwegsinfektionen kann sowohl zur Resolution der Infektion als auch zu deren Pathogenese beitragen. Die alpha, beta und gamma Interferone (IFN) sind essenziell wichtig für den Schutz vor und die Resolution von viralen Infektionen. IFN alpha und beta werden schon innerhalb der ersten 12 Stunden nach Infektion von respiratorischen Epithelzellen sezerniert. Dies induziert einen antiviralen Status in benachbarten Epithelzellen (parakriner Effekt) und inhibiert die Virusreplikation in der infizierten Zelle selbst (autokriner Effekt) durch Expression einer Vielzahl von antiviralen Effektorproteinen. Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$), das von aktivierten T-Zellen sezerniert wird und die

Einleitung

zelluläre antivirale Immunantwort aktiviert, induziert ebenfalls die Expression einer Reihe potenter Effektorproteine, darunter das IFN γ induzierbares Protein 10 (IP10), das auch als Chemokin CXCL10 bezeichnet wird. IP10 entsteht als primäres Translationsprodukt von 12 kDa. Nach ribosomalem Transfer an das endoplasmatische Retikulum und Schnitt durch die Signalpeptidase entsteht ein 10 kDa Protein, das dann posttranslational in ein 6-7 kDa Protein prozessiert wird. Dies ist dann die sekretorische Form des Protein, welches innerhalb von 30 Minuten nach IFN γ Stimulation sezerniert wird [48]. IP10 spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort auf paramyxovirale Atemwegsinfektionen, da das Zytokin sowohl dendritische Zellen als auch CD8⁺ T Effektorzellen aktiviert und in die Lunge rekrutiert [49]. Die Neutralisation von IP10 in RSV infizierten Mäusen exazerbiert die virusinduzierte pulmonale Pathologie und vermindert die Restriktion der viralen Replikation, d.h. RSV repliziert länger und zu höheren Titern [49]. IP10 wird, induziert durch virale Atemwegsinfektionen, sowohl von respiratorischen Epithelzellen als auch von bronchoalveolären Makrophagen sezerniert [50]. IP10 ist eines der am stärksten induzierten Zytokine viraler Atemwegsinfektionen und die Konzentration von IP10 korreliert mit der Erkrankungsschwere [51]. Neben den protektiven Effekten bei akuten viralen Atemwegsinfektionen wurden aber auch pathogenetische Effekte einer chronischen Aktivierung des IP10 Systems beschrieben, so bei chronischen viralen Infektionen und bei Autoimmunprozessen [52, 53].

2. Herleitung einer Aufgabenstellung

Grundlage und Hypothese der hier vorgestellten Arbeit sind im Wesentlichen zwei Annahmen. Erstens, die Immunogenität des attenuierten HPIV3 Lebendimpfstoffes B/HPIV3 lässt sich durch Expression des Immunmodulators IP10 weiter steigern. Zweitens, IP10 ist nicht für eine pulmonale Immunpathogenese verantwortlich.

Ziel dieser Arbeit war die Expression des IP10 Gens der Baumwollratte durch das attenuierte bovin/humane Parainfluenzavirus Typ 3 (B/HPIV3) und die Evaluierung dieses Impfstoffkandidaten gegen HPIV3 in der Baumwollratte.

Das IP10 Gen der Baumwollratte wurde als zusätzliche Geneinheit in das B/HPIV3 kodierende Plasmid eingebracht und wurde somit Teil des viralen Genoms nach erfolgreicher Isolierung infektiöser Viren im reversen Genetiksystem.

Nach erfolgreicher Generierung des B/HPIV3-IP10 Virus wurde die Sequenz des Virusgenoms bestimmt und die Expression des IP10 Proteins durch das Virus bestätigt. Die Kinetik des Virus wurde anhand einer Wachstumsanalyse kontrolliert.