

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin

**„Analyse der Immunantwort nach Infektion mit
Gelbfieberviren„**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



vorgelegt von
Hi-Gung Bae
Diplom-Biologin aus Berlin

Juli 2006

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Der Freien Universität Berlin

1. Gutachter: PD Dr. Matthias Niedrig, Robert Koch-Institut Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling, Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 27.10.2006.

Für den Mittelpunkt meiner Welt

„Die Neugier
steht immer an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will.“

Galileo Galilei

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ----- (7)

I. Einleitung

I.1 Das Gelbfiebervirus -----	(9)
I.1.1 Allgemeines -----	(9)
I.1.2 Klassifikation -----	(10)
I.1.3 Pathogenese -----	(10)
I.1.4 Diagnose – Nachweismethoden -----	(12)
I.2 Molekular- und Proteinbiologie von Flaviviren -----	(14)
I.2.1 Virusmorphologie und Genomorganisation -----	(14)
I.2.2 Proteine -----	(14)
I.2.3 Replikation -----	(16)
I.3 Der Impfstoff -----	(17)
I.4 Molekulare Determinanten der Attenuierung -----	(18)
I.5 Virale Volllängenkclone -----	(19)
I.6 Immunologie -----	(20)
I.6.1 Th-Zellen und Zytokine -----	(20)
I.7 Ziele der Dissertation -----	(23)

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien -----	(24)
II.1.2 Virusstämme -----	(24)
II.1.3 cDNA-Klone, Plasmide und Bakterien -----	(25)
II.1.4 Synthetische Oligonukleotide-----	(25)
II.1.5 Antikörper -----	(26)
II.1.6 Chemikalien, Medien, Puffer- und Gebrauchslösungen -----	(26)
II.1.7 Enzyme und Kits -----	(32)
II.1.8 Verbrauchsmaterialien -----	(33)
II.1.9 Geräte -----	(34)
II.1.10 Software -----	(35)

II.2 Methoden

<u>II.2.1 Sterilisationsverfahren, Gamma-Bestrahlung</u> -----	(36)
<u>II.2.2 Kultivierung von Zellen</u> -----	(36)
II.2.2.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen -----	(37)
II.2.2.2 Bestimmung der Zahl lebender Zellen -----	(37)
II.2.2.3 Stimulation der Zellen -----	(38)
II.2.2.4 Infektion von Zellen -----	(38)
II.2.2.5 Titration von YF-Viren und Titerberechnung mittels Plaque Assay -----	(39)
II.2.2.6 Neutralisationstest im Plaquetest -----	(39)
<u>II.2.3 Mikrobiologische Methoden</u> -----	(41)
II.2.3.1 Anzucht von Bakterien -----	(41)
II.2.3.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien ----	(41)
II.2.3.3 Transformation von kompetenten Bakterien -----	(41)
II.2.3.4 Kleine Plasmidpräparation -----	(42)
II.2.3.5 Große Plasmidpräparation -----	(42)
<u>II.2.4 Proteinbiochemische Methoden</u> -----	(44)
II.2.4.1 Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen ---	(44)
II.2.4.2 Messung der Proteinkonzentration -----	(44)
II.2.4.3 Dotblot -----	(45)
II.2.4.4 Immunopräzipitation -----	(45)

II.2.4.5 Westernblot -----	(46)
II.2.4.5.1 Die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE -----	(46)
II.2.4.5.2 Die Auftrennung der Proteine mittels nativer Gelelektrophorese -----	(47)
II.2.4.5.3 Der Transfer der Proteine auf eine Membran --	(48)
II.2.4.5.4 Die Proteindetektion -----	(49)
II.2.4.5.5 Silberfärbung von Protein-Gelen -----	(49)
II.2.4.6 Humaner IL-3 (hIL-3) ELISA -----	(50)
II.2.4.7 Humaner Zytokin Antikörper Array -----	(51)
<u>II.2.5 Mikroskopische Methoden</u> -----	(52)
II.2.5.1 Immunfluoreszenz, konfokale Laserscanning- Mikroskopie -----	(52)
II.2.5.2 Immunhistologie von Gewebeschnitten -----	(52)
II.2.5.3 Elektronenmikroskopie -----	(54)
II.2.5.3.1 Reinigung, Befilmen u. Stabilisieren der Trägernetze -----	(54)
II.2.5.3.2 Negativkontrastierung -----	(55)
II.2.5.3.3 Einbettung von Gewebeproben und Zellen in Epon -----	(55)
II.2.5.3.4 Auswertung am EM und fotografische Dokumentation -----	(57)
<u>II.2.6 Isolierung und Analyse von RNA</u> -----	(58)
II.2.6.1 RNA-Isolierung aus Gewebe -----	(58)
II.2.6.2 RNA-Isolierung aus Zellkulturüberständen -----	(60)
II.2.6.3 Virale RNA-Isolierung aus Zellkulturüberständen -----	(60)
II.2.6.4 Linearisierung und in vitro Transkription -----	(61)
II.2.6.5 Transfektion von RNA in Zellen -----	(62)
II.2.6.6 Gewinnung zellfreier virushaltiger Überstände -----	(62)
<u>II.2.7 Standard DNA-Techniken</u> -----	(63)
II.2.7.1 Konzentrationsbestimmung von DNA -----	(63)
II.2.7.2 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung von Nukleinsäuren -----	(63)
II.2.7.3 Agarosegelelektrophorese von DNA und RNA -----	(64)
II.2.7.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ---	(64)
II.2.7.5 Klonierung mit Hilfe des Topo Ta Cloning-Kit -----	(64)
II.2.7.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen -----	(65)
II.2.7.7 Dephosphorylierung -----	(66)
II.2.7.8 Ligation von DNA-Fragmenten mit DNA-Ligase -----	(66)
II.2.7.9 Polymerasekettenreaktion -----	(66)
II.2.7.9.1 Reverse Polymerasekettenreaktion -----	(66)
II.2.7.9.2 Mykoplasmen-PCR -----	(67)
II.2.7.9.3 Kolonie-PCR -----	(67)
II.2.7.9.4 TaqMan-Polymerasekettenreaktion -----	(68)
II.2.7.9.5 Quantitect One Step RT-PCR -----	(69)
II.2.7.9.6 Detektion von Zytokinen mittels TaqMan-PCR -	(70)
II.2.7.9.7 Nachweis von Referenzgenen mittels PCR -----	(70)
II.2.7.9.8 Sequenzierung von DNA -----	(71)
II.2.7.9.9 Gerichtete Mutagenese und DpnI-Spaltung ----	(72)
<u>II.2.8 FACS-Analyse</u> -----	(74)
<u>II.2.9 Phylogenetische Analyse</u> -----	(74)
<u>II.2.10 Klassifikation der Impfzwischenfälle (YEL-AE) nach <u>YFV 17D-Impfung</u> -----</u>	(76)

III. Ergebnisse	
III.1 Nachweis von Gelbfiebertviren	(78)
<u>III.1.1 Nachweis der Nukleinsäure</u>	(78)
III.1.1.1 Die RT-Reaktion	(78)
III.1.1.2 Die TaqMan-PCR	(80)
III.1.1.3 Referenzgenanalyse	(83)
III.1.1.4 Der Plaque Assay und seine Korrelation mit der TaqMan-PCR	(84)
III.1.1.5 Virusinaktivierung durch Gamma-Bestrahlung	(86)
<u>III.1.2 Nachweis der Antigene</u>	(87)
III.1.2.1 Westernblot	(87)
III.1.2.2 Protein Dotblot	(87)
III.1.2.3 Natives Gel und modifizierter Westernblot	(88)
III.1.2.4 Immunfluoreszenz	(89)
III.2 Erzeugung und Charakterisierung mutierter infektiöser Gelbfieber-Volllängenklone	(92)
III.2.1 Charakterisierung der in vivo Funktion des E-Proteins mittels monoklonaler Antikörper	(92)
III.2.2 Charakterisierung der Gelbfieber-Volllängenklone YFV- pACNR/FLYF-17DpMutE52, -pMutE200 und pMutE299	(94)
III.2.3 Transfektion verschiedener Zelllinien	(98)
III.2.4 Infektionsstudien mit den erzeugten Gelbfiebertvolllängen- klonen in Zellkultur mittels Reinfektion	(102)
III.3 Analyse und Vergleich von importierten Gelbfiebertvirus- Stämmen afrikanischer Herkunft	(104)
III.3.1 Design eines Primersets zur vollständigen Sequenzierung diverser Gelbfiebertstämmen	(104)
III.3.2 Analyse der afrikanischen Gelbfiebertfälle IvoryC1999 und Gambia2001	(106)
III.4 Untersuchung der Immunantwort nach Gelbfieber- impfung bzw. –Infektion	(112)
III.4.1 Zytokinantwort nach Gelbfiebertimpfung und –infektion	(112)
III.4.2 Analyse der Gelbfiebertimpfassozierten Erkrankungen	(118)
III.4.2.1 YEL-AVD mit fatalem Ausgang	(120)
III.4.2.2 YEL-AVD im Vergleich zur YFV-Impfung ohne Komplikationen	(123)
IV. Diskussion	
IV.1 Nachweis von YFV	(128)
IV.2 Vergleich des YFV-Infektionsverlaufes bei YFV_{Inf}, Impfungen und YEL-AE	(132)
IV.3 Vergleich der Zytokinausschüttung nach YFV-Infektion bei YFV_{Inf}, Impfungen und YEL-AE	(137)
IV.4 Mutagenesestudien eines 17D-Volllängenklons	(143)
V. Zusammenfassung	(146)
VI. Literaturverzeichnis	(148)
Danksagung	(162)
Vorveröffentlichungen und weitere eigene Publikationen	(163)
Summary	(165)
Lebenslauf	(167)

Abkürzungsverzeichnis

α -MEM	Alpha-Minimum Essential Medium	FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
A	Adenin	FAM (F)	6-Carboxy-Fluoreszein
Å	Angström	FITC	Fluoreszeinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
Abb.	Abbildung	FKS	fötales Kälberserum
ad	bis zu	g	Gramm
AG	Arbeitsgruppe	G	Guanin
Aq / Aqua	Wasser	GE	Genomäquivalent
AK	Antikörper	G-GT	Gamma-Glutamyltranspeptidase
as	antisense	GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase Synonym: AST, ASAT
AS	Aminosäure	GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Synonym: ALT, ALAT
ATCC	American Type Culture Collection (amerikanische Zellkultursammlung)	GTC	Guanidiniumisothiocyanat
ATP	Adenosintriphosphat	GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen Koloniestimulierender Faktor
bidest.	zweifach destilliert	h	Stunde(n)
bp	Basenpaar(e)	IF	Immunfluoreszenz
BSA	Rinderserumalbumin	IFN	Interferon
bzw.	beziehungsweise	IgG	Immunglobulin G
°C	Grad Celsius	IgM	Immunglobulin M
C	Cytosin	IL	Interleukin
ca.	circa	IU	International Unit
CD	Cluster of Differentiation (immunphänotypische Zelloberflächenantigene)	Kap.	Kapitel
cDNA	komplementäre DNA	kD	Kilodalton
cLSM	konfokales Laserscanning Mikroskop	kV	Kilovolt
cm	Zentimeter	L	Liter
CO ₂	Kohlendioxid	L13	ribosomales Protein L13
CPE	zytopathischer Effekt	LB	Luria Broth
CsCl	Cäsiumchlorid	μ g	Mikrogramm (10^{-6} g)
C _T	Schwellenwertzyklus	μ L	Mikroliter (10^{-6} L)
DC	Dendritische Zelle(n)	μ m	Mikrometer (10^{-6} Meter)
DEPC	Diethylpyrocarbonat	μ M	Mikromolar (10^{-6} M)
dest.	destilliert	M	Molar
d.h.	das heißt	mA	Milliampere
D-MEM	Dulbeccos Minimum Essential Medium	MAK	Monoklonaler Antikörper
DMSO	Dimethylsulfoxid	MEM	Minimum Essential Medium
DNase	Desoxyribonuklease	mesh	Maschen pro Inch
DNS	Desoxyribonukleinsäure	mg	Milligramm (10^{-3} g)
dNTPs	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
dNUTPs	Desoxy-Uridin-Triphosphate	min	Minute(n)
dpi	Tage nach Infektion	mL	Milliliter (10^{-3} L)
dpv	Tage nach Impfung	mm	Millimeter (10^{-3} Meter)
DTT	Dithiothreitol	mM	Millimolar (10^{-3} M)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	MOI	Multiplicity of Infection (Infektionsdosis)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (Enzym Immuno Assay)	mRNA	Boten RNA
et al.	et alii	N bzw. n	Anzahl
		NCR	nicht-kodierende Region
		ng	Nanogramm (10^{-9} g)

nm	Nanometer (10^{-9} Meter)	Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
NS	Nicht-Strukturprotein	U	Uracil
nt	Nukleotid	u.a.	unter Anderem
OD	optische Dichte	u.ä.	und Ähnliches
P	Wahrscheinlichkeitswert	UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
PA	Polyallomer	ÜN	über Nacht
PAGE	Polyacrylamid Gel Electrophorese	UpM	Umdrehung pro Minute
PAK	Polyklonaler Antikörper	UV	Ultraviolett
PBMC	periphere mononukleäre Zellen	UZF	Ultrazentrifugation
PBS	Phosphat gepufferte Saline	V	Volt
PCR	Polymerase Ketten Reaktion	Vol	Volumen
PFU	infektiöse Einheit, Plaquebildende Einheit	v/v	Volumen/Volumen
pg	Pikogramm (10^{-12} g)	v/w	Volumen/Gewicht
pH	pondus hydrogenii	wt	Wildtyp
pmol	Pikomol (10^{-12} mol)	w/v	Gewicht/Volumen
pMutE52	YFV pACNR/FLYF-17D mit Mutation im E-Protein-Gen an Stelle 52 (Arg→Gly)	YEL-AE	yellow fever adverse event
pMutE200	YFV pACNR/FLYF-17D mit Mutation im E-Protein-Gen an Stelle 200 (Thr→Lys)	YEL-AND	yellow fever vaccineassociated neurotropic disease
pMutE299	YFV pACNR/FLYF-17D mit Mutation im E-Protein-Gen an Stelle 299 (Ile→Met)	YEL-AVD	yellow fever vaccineassociated viscerotropic disease
PP	Polypropylen	YEL-AVD _{Fat}	YEL-AVD mit fatalem Ausgang
PPI	Peptidyl Prolyl Isomerase A	YF	Yellow Fever (Gelbfieber)
pYFV 17D	YFV pACNR/FLYF-17D	YFV	Yellow Fever Virus (Gelbfiebervirus)
R	Regressionswert	WB	Westerblot
RKI	Robert Koch-Institut	z.B.	zum Beispiel
RNase	Ribonuklease	ZBS	Zentrum für Biologische Sicherheit am RKI
RNA	Ribonukleinsäure	%	Prozent
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin		
RPMI	Rosewell Park Memorial Insitute (Medium)		
RT	Raumtemperatur		
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR		
s	sense		
SDS	(Natriumdodecylsulfat)		
sek	Sekunden		
T	Thymin		
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TAMRA (T)	6-Carboxy-Tetramethyl- Rhodamin		
TBE	Tris-Borat-EDTA		
TBP	TATABox bindendes Protein		
TCID ₅₀	mittlere Infektionseinheit in Zellkultur		
Temp	Temperatur		
Tm	Schmelztemperatur		
TM	TaqMan [®] -Sonde		



Hi-Gung Bae¹ für die AG Niedrig
¹Robert Koch Institut, Nordufer 20, Berlin, Germany

Danksagung

leider nur in 2D ;-)



Wie fing alles an

Das RKI ist ein infektiöses Agens, das vor allem junge Menschen infiziert. Eine junge Frau im Alter von 23 Jahren kam erstmals 1997 in Kontakt mit dem RKI. Hans Gelderblom, Muhsin Özel, Freya Kaulbars, Stefan Biere und Stefan Biel waren die ersten nachweisbaren Erreger im Anfangsstadium des RKI-Syndroms. In dem dunklen Nanokosmos wurden nach Urin-mikroben

gesucht. Nach anfänglicher Remission nahm die Pathogenese einen weiteren Anlauf mit der AG Niedrig und erreichte ihren Höhepunkt nach einer Inkubationszeit von einigen Jahren mit der Symptomatik langanhaltender Identifikation. Allein das Vollsyndrom wurde nicht erreicht. Begleiterscheinungen waren überlange Nächte, Publikationen, Kongresse und Koope-

rationen. Nebensymptome äußerten sich in Beamerabende voller Speis und Trank, Cocktails, Kochabende, Parties, Schoki und Gummibärchen im Überfluss. Zwei Weltmeisterschaften und eine Europameisterschaft später, konnte die Patientin geheilt und in die weite Welt entlassen werden. Der Titer war zwar nicht mehr hoch, aber dennoch fest mit der Person verbunden.

Material und Methoden

Räume

ROBERT KOCH-INSTITUT ZBS1, AG Niedrig



Untersuchungsprobanden



Ergebnisse

Einen großen herzlichen Dank an Matthias Niedrig, dass er ein Chef war, der mir vieles ermöglichte (cLSM-Betreuung, Diplomanden&Doktoranden Organisation, Lehre, Austausch bzw. Kooperationen in Kuba, Hamburg und der Schweiz), auch wenn ich mich dabei sehr zerstreuen konnte. Ich bin Ihnen sehr für die Zeit, Ihre Diskussionsbereitschaft und die wissenschaftlichen Möglichkeiten dankbar.

Herzlichen Dank an Professor Schmülling, dass er sich dieser Arbeit annahm und er mir in der Lehre vertraute.

Danke an die Kooperationspartner Dirk Teuwen, Cristina Domingo Carrasco, Christian Drosten, Herbert Schmitz, Petra Emmerich, Jan TerMeulen, Andreas Pahl, Andreas Nitsche, Stefan Pest, Tuula Geske und vor allem Aleksandar Radonic (dem Letzten in unserem Bunde: go, go, gooo...). Auch diese Diss kann nicht ohne die Hilfe von Kooperationspartnern, denen ich hiermit sehr danken möchte.

Beate Kümmerer möchte ich besonders danken, da ich durch sie die Welt der Klone entdecken konnte und wir uns auch auf anderen Ebenen austauschen konnten. Viel Erfolg für die Zukunft.

Oli D., der temperamentvolle Halbspanier, der es sich auch mal von einer "Professionellen" besorgen lässt ;-). Dejanos seguir ser sincero en el futuro.

Oli B. (Pilz-Oli, unser erster Ehemann in dieser Bande) & Agent Müller (unser Starsänger): Dankeschöö für die Tipps in der Welt der Proteine.

René, der schöngeistige Literat, der immer ein Zitat hatte parat: Danke für die vielen deutschen Leckereien und die literarischen Ergüsse und Diskussionen.

Nadine und Matze (meine "Kleinen"), die Arbeit und der Spaß mit Euch war wirklich klasse. Ich wünsche jedem solche engagierten Dips :-).

Axel und Stephan (Statler und Waldorf), Teichi, Regina, Fr. Sim und Kretzschi (die Urgesteine), Inga und Petra (Eurolmmunianer), Bettina, Petra B., Diba, Jens und Gert (die Neuzugänge unserer AG), Kim (unsere Ex), Stefan Biel und Stefan Biere (meine ersten Vorbilder im RKI) haben dem Leben im RKI einen familiären Touch gegeben. Danke

Liebe Om-Ma, lieber Ab-Ba, liebe Hi-Sun, lieber Hyeng-Jun und lieber Johannes:
 Ihr seid der Mittelpunkt meines Lebens - immer - und dafür bin ich Euch zutiefst dankbar.



Schlussfolgerung

Es war eine schöne Zeit am RKI - mit Höhen und Tiefen - aber mit vielen tollen Momenten. Ich bin froh, in dieser Zeit so viele liebe Menschen kennengelernt zu haben. Ich werde Euch vermissen, aber nicht lange, denn wir sehen uns wieder. Bis dahin, drückt Euch ganz doll eure Hi-Gung =)

Referenzen

Detaillierte Ergebnisse und grafische Auswertung sind veröffentlicht [Bae et al., 2006] und im RKI (NU, Haus 4, 4.OG, Flur) einsehbar.



Liste der aus dieser Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen und weitere eigene Publikationen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Freien Universität Berlin, vertreten durch Herrn Prof. Thomas Schmülling, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Vorveröffentlichungen (Publikationen)

Doblas A*, Domingo C*, **Bae HG***, Bohorquez CL, de Ory F, Niedrig M, Mora D, Carrasco FJ, Tenorio A. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease and death in Spain. *J Clin Virol.* 2006 Apr 3.

Bae HG, Drostén C, Emmerich P, Colebunders R, Hantson P, Pest S, Parent M, Schmitz H, Warnat MA, Niedrig M. Analysis of two imported cases of yellow fever infection from Ivory Coast and The Gambia to Germany and Belgium. *J Clin Virol.* 2005 Aug; 33(4):274-80.

Radonic A, Thulke S, **Bae HG**, Müller MA, Siegert W, Nitsche A. Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections. *Virology J.* 2005 Feb 10; 2(1): 7.

Ter Meulen J, Sakho M, Koulemou K, Magassouba N, Bah A, Preiser W, Daffis S, Klewitz C, **Bae HG**, Niedrig M, Zeller H, Heinzl-Gutenbrunner M, Koivogui L, Kaufmann A. Activation of the Cytokine Network and Unfavorable Outcome in Patients with Yellow Fever. *J Infect Dis.* 2004 Nov 15; 190(10): 1821-1827.

Bae HG*, Nitsche A*, Teichmann A, Biel SS, Niedrig M. Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *Journal of Virological Methods.* 110(2): 185-91, 2003 Jun 30.

* gleichberechtigte Autoren

Weitere Publikationen

Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Stengel A, **Bae HG**, Andresen V, van der Voort IR, Veh RW, Werner CR, Klapp BF, Wiedenmann B, Wang L, Tache Y, Monnikes H. CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Mar;288(3):R751-8.

Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, **Bae HG**, Ruter J, Klapp BF, Wiedenmann B, Monnikes H. Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2004 Apr;13(1):45-52.

Lemmer K, Donoso Mantke OD, **Bae HG**, Groen J, Drosten C, Niedrig M. External quality control assessment in PCR diagnostics of dengue virus infections *Journal of Clinical Virology* 30 (2004): 291-296.

Summary

Yellow Fever 17D vaccine is one of the oldest and most successful vaccines ever developed and belongs to the most important vaccines in prevention of serious Yellow Fever (YF) in Africa and South America.

The various mechanisms of a protective immune response against the Yellow Fever Virus (YFV) infection and the outcome of Yellow fever adverse events (YEL-AE) are still widely unknown.

In this study essential methodological improvements concerning future studies on immune response were elaborated.

The developed TaqMan-PCR allows a quantification of YFV and YFV-infection related gene expression in infected samples (serum, tissue) with high accuracy. Three genes (L13, TBP, PPI) were determined as reference genes, which are in contrast to β -actin constitutively expressed in YFV infected cells and tissue.

The cytokine array permits in comparison to other methods a cost-efficient, rapid, broad, and semi-quantitative determination of cytokines.

The set of primers for sequence analysis of highly variable regions within the YFV genome allows a fast characterization of virus strains in vaccinated persons with or without side effects, so that virus mutations could be excluded as cause of complications.

With these established and improved methods YFV infections after vaccination and after wild type infection could be examined. From the comparative analysis of the immune response of YFV-wild type infected (YFV_{Inf}), YFV vaccinated (vaccinees) and YFV adverse events (YEL-AE) new insights regarding YFV induced immune response could be achieved.

The clinical data, the virus titer as well as the neutralizing antibodies of YFV_{Inf} and YEL-AE indicate that persons with YFV infection and YFV viscerotropic adverse events (YEL-AVD) with fatal outcome (YEL-AVD_{Fat}) show a very similar image and are hardly differentiated. YEL-AE with non fatal outcome vary in their manifestations. A reverse mutation from vaccine to wild type strain can be excluded as cause for YEL-AE due to the here performed sequence analysis. Therefore the focus for future studies should be laid on host factors.

In this study a partial issue of the cellular immune response was investigated as a host specific factor. It could be shown that the activation of the immune response by YFV-infection regarding the cytokines is lower as well in the vaccinees as in YEL-AE than in YFV_{inf}. The number of the cytokines and the amount of their release are considerably stronger in YEL-AE than in vaccinees. This could be linked with the severity of side effects. Thereby the cytokines IL-6, IL-8, GRO, MIG, MCP-1, TGF- β 1, TNF- β und RANTES could play a major role. In the YEL-AVD_{Fat} the same cytokines (IL-6, IL-8, MCP-1) were highly elevated as well as in YFV_{Inf}. GRO and MIG could also be measured in high concentrations in YEL-AVD_{Fat}. In the measurement of cytokines on protein level, persons without side effects showed only a high reactivity for RANTES, while other cytokines were only rarely or not detectable.

Furthermore three mutation sites were analyzed in the E-protein region of the YFV-17D vaccine strain, which are suspected to be the reasons for the attenuation of YFV. The E-protein is supposed to be responsible for the virulence. Eight amino acids of the E-protein seem to be very interesting targets. Three of them were changed for mutation studies to get insights about the molecular determinants of the attenuation. The substitution mutants pMutE52 and pMutE200 showed in contrast to the wild type and the vaccine strain a similar replication efficiency while pMutE299 could not replicate in cell culture.

The results of this study support the findings, that especially the cellular immune response after YFV infection and vaccination give a clear diagnostically indication regarding the course of infection and vaccination, respectively. The immune response as well the primary infection of cells by YFV needs further investigations to clarify the activation of a protective immune response. This will help to find out details regarding the mechanism which could conduct to severe cases with side effects and deaths after YFV vaccination.

To elucidate the causes of attenuation of YFV vaccination strains further comparative studies by reverse genetics as well as by alternative methods for the detection of viral fitness (replication efficiency, infectivity) are necessary to understand the specific molecular mechanism of the phenotypic effects.

CURRICULUM VITAE

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

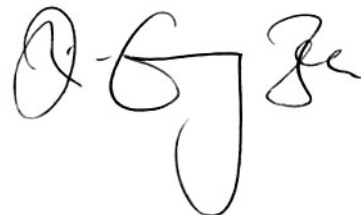
Bescheinigung

gem. § 5 Abs. 4 und Abs. 2b der Promotionsordnung des
Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Analyse der Immunantwort nach Infektion mit Gelbfiebertviren,“

Selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters that appear to read 'H-G Bae'.

(Hi-Gung Bae)

Berlin, den 24. Juli 2006