

I. Einleitung

I.1 Das Gelbfiebervirus

I.1.1 Allgemeines

Das Gelbfiebervirus (YFV) ist ein schweres hämorrhagisches Fieber verursachendes Virus, das zwischen Affen, Menschen und Mosquitos übertragen wird und in der trockenen Saison in Mosquito-Eiern überleben kann. Es ist das erste humane Virus, das isoliert und im Labor kultiviert werden konnte und für das von Nott, Beaupterthuy und Finlay erstmals ein an Insekten gebundener Übertragungsweg beschrieben wurde [Finlay, 1881]. Es ist endemisch im tropischen Afrika und Südamerika und verursacht Hämorrhagien, Multiorganversagen und Schock mit einer Letalität von 20-50 % der schwer erkrankten Fälle [Monath und Barrett, 2003; Monath und Heinz, 1996; WHO, 1998; Robertson et al., 1996].

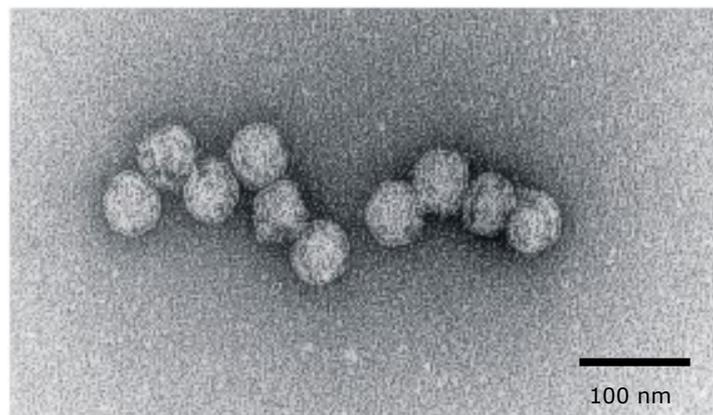


Abbildung I.1: Elektronenmikroskopisches Bild von Flaviviren. Nach Anreicherung mittels Ultrazentrifugation und Negativ-Kontrastierung. Das Virion ist behüllt und hat einen Durchmesser von ca. 40-50 nm.

Obwohl es einen Impfstoff gibt und in Kombination mit Vektorkontrollen die massiven Ausbrüche verhindert werden, bleibt die Krankheit weiterhin ein Problem in den tropischen Regionen der Welt. Es gibt schätzungsweise immer noch jährlich ca. 200.000 Infektionen weltweit, wovon ca. 30.000 sterben [Vainio und Cutts, 1998]. Das Virus gehört zu den wieder stärker auftauchenden Viren [Tomori, 2004; Robertson et al., 1996] und die Krankheit zählt zu den drei Infektionskrankheiten (Pest, Cholera sind die beiden anderen), die den internationalen Quarantäne Regularien unterworfen ist [WHO, 1985]. Die extreme Letalität von Gelbfieber (YF) wird auch deutlich, wenn man bedenkt, dass die LD_{50} für Affen weniger als eine Plaque bildende Einheit (PFU) beträgt

[Monath, 2001]. Bei der Virustitration wird die Menge an infektiösem Virus bestimmt und angegeben in infektiösen Einheiten (PFU) pro mL. Ein Plaque geht dabei auf ein infektiöses Partikel zurück.

I.1.2 Klassifikation

Die Familie der Flaviviridae besteht aus drei Genera, Flavivirus, Pestivirus und Hepacivirus. YFV ist eines von 70 Flaviviren und repliziert, wie die meisten Flaviviren, in einem Vertebraten-Arthropoden-Übertragungszyklus, wobei die Replikation sowohl in Vertebraten, als auch in den Arthropoden stattfindet. Da die Übertragung von YFV durch Arthropoden stattfindet, wird YFV auch zu den Arboviren („arthropod-borne viruses“) gezählt [Fields Virology, 2001].

I.1.3 Pathogenese

Mit dem Mosquitostich gelangt das Virus in den Blutkreislauf und infiziert Endothelzellen, Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten, nahe der lokalen Einstichstelle. Das Virus gelangt in die Lymphknoten und verbreitet sich weiter bis zur Leber, Milz, Niere, Knochenmark und Myokard [Kerr, 1951]. Durch den Befall der Leber werden die Kupfferschen Sternzellen in Mitleidenschaft gezogen und sterben ab. Nach einer Inkubationszeit von 3 bis 6 Tagen ist die virämische Phase durch Fieber, Muskelschmerz, Kopfschmerz, Appetitlosigkeit und Übelkeit gekennzeichnet.



Abbildung I.2: *Aedes aegypti*. Der hauptsächliche Arthropoden-Vektor für YFV. Die geografische Verbreitung liegt zwischen 30° nördlicher und 20° südlicher Breite und hat eine ausgeprägte Vorliebe für menschliche Habitate (einschließlich artifizierlicher Brutstätten, wie in Reifen, Blumenvasen, Wassersammelbecken u.ä.) [Severson et al., 2004]. Andere *Aedes spp.* und *Haemagogus*-Arten können ebenfalls das YFV übertragen [Mutebi et al., 2002, Monath, 1989].

Die meisten Personen erholen sich nach 3 bis 4 Tagen, doch bei ca. 15 % geht die Krankheit innerhalb von 24 Stunden in die toxische Phase über. Die weitere

Zerstörung der Hepatozyten durch die Viren hat einen starken Transaminaseanstieg zur Folge. Die Intoxikation zeichnet sich durch disseminierte intravasale Gerinnung, wieder ansteigendes Fieber, hämolytische und hepatische Gelbsucht (daher der Name Gelbfieber), Dehydratation, Blutdruckabfall, abdominale Schmerzen und Erbrechen aus. Blutungen können aus Nase, Mund oder Augen austreten, aber auch innere Blutungen treten mit der verbundenen Leberzellzerstörung und die damit einhergehende verringerte Bildung an Blutgerinnungsfaktoren auf. Der Verlauf der Krankheit ist in Abbildung I.3 schematisch dargestellt. Die Schwere der Krankheit ist sehr variabel, ca. 20-50 % der Fälle, die diese zweite Phase erreichen, sterben letztendlich an Leber- und Nierenversagen, Schock und Delirium.

Aus Mangel an spezifischen Therapien für YF-Patienten ist nur eine unterstützende Behandlung möglich [Tomori, 2004].

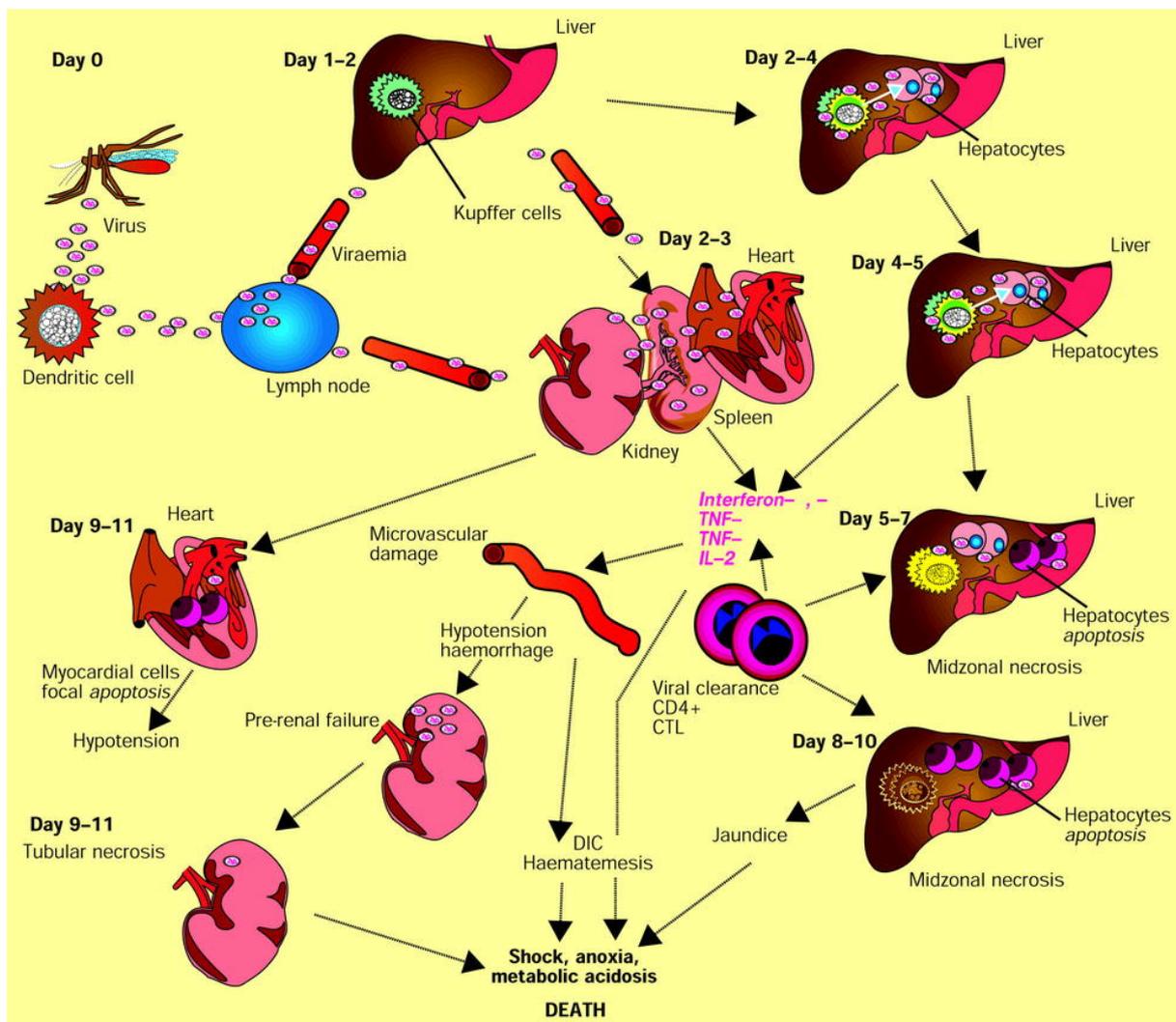


Abbildung I.3: Verlauf der Ausbreitung des YFV in den verschiedenen Zellen bzw. Organen. [Monath 2004]

I.1.4 Diagnose - Nachweismethoden

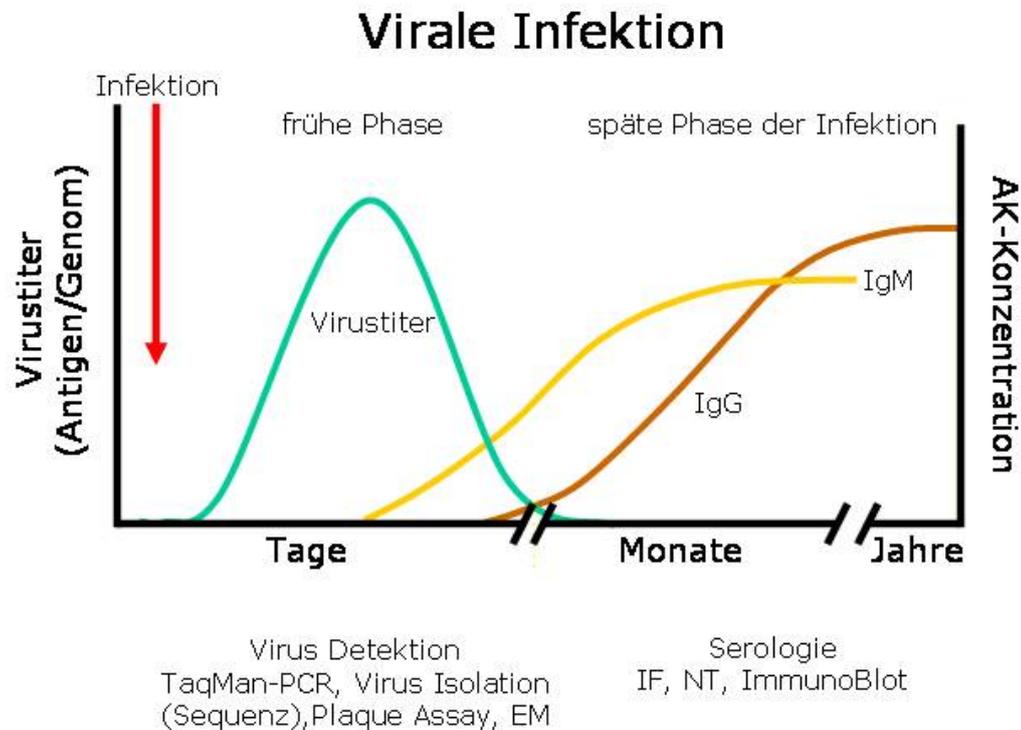


Abbildung I.4: Virale Infektion und seine messbaren Parameter im Verlauf der Zeit.

Für YFV gibt es eine breite Palette an diagnostischen Tests, die einen direkten und indirekten YFV-Nachweis erlauben. Dabei kommen Methoden zur Virus-Isolierung, -Antigendetektion, -Serologie und molekulare Techniken zum Einsatz. Bei der Virusisolierung werden dem Virus Zellkulturen als lebendes System bereitgestellt, in dem es sich vermehren kann. Die Viruspartikel können zwar nicht direkt gesehen werden, doch oft wird eine Veränderung von virusinfizierten Zellen durch den so genannten Zytopathischen Effekt (CPE) mit Hilfe eines Lichtmikroskops wahrgenommen. Bei der viralen Antigendetektion werden immunologische Techniken sich zu Nutze gemacht, um die Präsenz der viralen Antigene durch das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern zu demonstrieren [Vasquez et al., 2003]. Die Antigen-Antikörperbindung können beispielsweise durch Agglutinationsreaktionen oder Fluoreszenztechniken sichtbar gemacht werden [Koraka et al., 2002; Niedrig et al., 1999]. In der Serologie werden spezifische Antikörper, die im Wirtsorganismus als Antwort auf eine virale Infektion produziert wurden, detektiert. Dies ist vor allem nützlich,

wenn weder das Virus isoliert noch seine Antigene detektiert werden konnten. Molekulare Techniken in der Virus-Diagnostik finden aufgrund ihrer Schnelligkeit und Empfindsamkeit immer häufiger Anwendungen und werden als Standardmethoden eingesetzt [Deubel et al., 1997]. Besonders die Real-Time-PCR, die neben der schnellen Detektion der viralen Nukleinsäure auch deren Quantifizierung erlaubt, kommt immer häufiger in der Diagnose zum Einsatz [Bae et al., 2003].

Die Virusdiagnostik ist aber nicht nur auf diese vier Möglichkeiten beschränkt. Neben den weiteren klassischen virologischen Methoden soll hier nur noch die Elektronenmikroskopie erwähnt werden. Diese Methode besitzt zwar nicht dieselbe Sensitivität und Spezifität wie die oben beschriebenen Methoden, aber sie ermöglicht durch den „offenen Blick“ auf die Probe, die Möglichkeit, alle Erreger zu erfassen, ohne spezifisch danach zu fragen [Biel und Gelderblom 1999].

I.2 Molekular- und Proteinbiologie von Flaviviren

I.2.1 Virusmorphologie und Genomorganisation

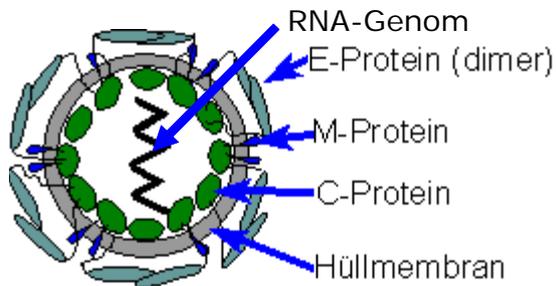


Abbildung I.5: Aufbau eines Flavivirus-Partikels (modifiziert nach Modrow, 2003). Das Kapsid wird aus den C-Proteinen gebildet, umschließt die virale RNA und ist umhüllt von der Hüllmembran, in der die E- und M-Proteine verankert sind. prM tritt als Vorläuferprotein vom M-Protein auf. C: Kapsid, M: Membran, E: Envelope (Hüllmembranprotein).

Flaviviren sind kleine ikosaedrische, behüllte Viren und haben einen Durchmesser von 40-50 nm. Sie besitzen eine RNA in Plusstrangorientierung von annähernd 11 kb. Eingeschlossen wird das Genom durch ein Kapsid (C), das nur aus einem viralen Protein besteht. Dieses ist umschlossen von einer Lipid-Bilayer-Hüllmembran, die von der Wirtsmembran stammt, in denen zwei virale Oberflächenproteine (Membran M, Envelope E) eingelagert sind (Abbildung I.5). Das YFV-RNA-Genom besitzt einen großen offenen Leserahmen („open-reading-frame“ ORF) von 10.233 Basen, von dem ein Polyprotein synthetisiert wird, das später in die einzelnen Virusproteine gespalten wird. Am 5´-Ende befinden sich die Strukturproteine gefolgt von den Nichtstrukturproteinen (NS) (5´-C-prM/M-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3´) [Rice et al., 1985]. Flankiert wird der ORF am 5´ und 3´-Ende von nicht kodierenden Regionen (NCR). Das 3´-Ende ist nicht polyadenyliert.

I.2.2 Proteine

Das Polyprotein umfasst 3411 Aminosäuren und wird posttranslational und co-translational proteolytisch durch eine zelluläre (Signalase) und mehrere virale Proteasen (Serinprotease) in funktionell aktive Bestandteile gespalten. In Tabelle I.1 sind die Proteine und ihre Eigenschaften zusammengefasst.

TABELLE I.1:
Molekulargewicht, Anzahl der Aminosäuren und Funktion der YFV-Proteine

Protein	Molekulargewicht [kDa] / Anzahl AS	Funktion
C:	12-14 / 120	Kapsidprotein, Interaktion mit RNA zum Nukleokapsid [Rice et al., 1985]
prM:	9-11 / 89	Vorläuferprotein von M, schützt das E-Protein vor Konformationsänderungen [Heinz et al., 1994], Spaltung spielt regulatorische Rolle in Virulentwicklung [Elshuber et al., 2003]
M:	7-9 / 75	Membranprotein, Membranfusion [Guirakhoo et al., 1991]
E:	51-60 / 493	Membranprotein, Induktion der protektiven Immunantwort, Hämagglutinierende Eigenschaft, Rezeptorbindung, liegt als Dimer vor, Virulenz, Attenuierung [Arroyo et al., 2001a]
NS1:	39-40 / 409	Zellmembranassoziiert als Dimer, sezernierte Form als Hexamer, Virusreifung und -freigabe, RNA-Replikation [Lindenbach und Rice, 1999; Muylaert et al., 1996]
NS2A:	23-25 / 167	NS1-Reifung, Teil des Replikase Komplex, Interaktion mit NS3, NS5 und 3'NCR, ein zytotoxischer T-Zell Epitop wurde mit NS2A lokalisiert [Burke und Monath, 2001]
NS2B:	14 / 130	Kofaktor der NS3-Protease [Yusof et al., 2000, Droll et al., 2000]
NS3:	68-70 / 623	Bifunktionell: Protease- und Helikaseaktivität [Chambers et al., 1991]
NS4A:	16 / 287	Membranassoziierte Replikasekomponente, interagiert mit NS1 [Lindenbach und Rice, 2001]
NS4B:	26-28 / 112	Teil des Replikase Komplex, involviert in Membranrestrukturierung während der viralen Infektion [Brinton, 2002]
NS5:	103-104 / 806	RNA-Capping, RNA abhängige RNA-Polymerase, Methyltransferase [Lindenbach und Rice, 2001]

Das E-Protein ist das größte Strukturprotein und die Hauptkomponente der Virusoberfläche. Es liegt glykosyliert in der Virushülle vor und lässt sich in drei Domänen unterteilen (I-III). Die kristalline Struktur wurde anhand der Proteine der Flaviviren Tick Borne Enzephalitis TBE [Rey et al., 1995] und Dengue-2 [Modis et al., 2003] aufgeklärt. Es ist ein typisches virales Fusionsprotein der Klasse II. Das E-Protein liegt als Dimer parallel zur Virusmembran vor und besitzt Epitope der Antikörpererkennung. Weiterhin ist es für die Vermittlung der Adsorption und für hämagglutinierende Eigenschaften der Flaviviren bekannt. Das E-Protein steht auch im Verdacht für die Virulenz verantwortlich zu sein. Durch die große biologische Bedeutung des Proteins fokussieren sich viele Studien auf dieses Protein.

I.2.3 Replikation

Der zelluläre Rezeptor für YFV ist nicht bekannt. Nach der Adsorption an die Zelloberfläche gelangt das Virus durch rezeptorvermittelte Endozytose, mit einer anschließenden pH-abhängigen Fusion in die Zelle [Burke und Monath, 2001]. Dabei wird das Innere des Endosoms angesäuert, so dass die Endosommembran mit der Membran des Virus verschmelzen und das Kapsid mit der in ihm enthaltenen RNA in das Zytoplasma freigelassen werden kann. Die Konformationsänderung des E-Proteins vom Dimer zum Trimer ist Bedingung, damit die Fusion eingeleitet werden kann [Heinz et al., 1994]. Alternative Mechanismen mittels immunvermittelter Verstärkung („antibody-dependent-enhancement“) konnten in vitro für YFV und andere Flaviviren gezeigt werden [Fagbami et al., 1988; Halstead und O'Rourke, 1977]. Diese Studien haben gezeigt, dass das Virus auch über die Bindung von Immun-Komplexen über die Fc-Rezeptoren in die Zellen gelangen kann.

Die RNA wird durch seine 5'-Cap-Struktur an zelluläre Ribosomen-Untereinheiten gebunden. Das so entstehende Polyprotein wird in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eingelagert, wo die mit dem ER assoziierte Signalase das Polyprotein in die Strukturproteine C, prM und E spaltet. Die Spaltungen im Nichtstrukturproteinbereich werden durch virale Proteasen durchgeführt.

Der Replicase-Komplex (RC) vermittelt in zwei Schritten die Replikation. Erst wird mit Hilfe der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (NS5) anhand der Plusstrang-RNA eine RNA in Minusstrangorientierung synthetisiert, die im zweiten Schritt als Matrize für die Produktion vieler neuer Plusstrang-RNAs dient. Die RNA-Synthese verläuft semikonservativ und asymmetrisch, was üblicherweise zu einem 20- bis 100-fachen Überschuss von positiver zu negativer RNA führt [Lindenbach und Rice, 2001]. Negativstrang-RNA ist immer am RC gebunden und scheint nie frei in der Zelle persistieren zu können [Khromykh und Westaway, 1997]. Flavivirus-RNA ist ca. sechs Stunden nach Infektion in Invertebraten-Zellen vorzufinden [Chu und Westaway, 1985].

Die Replikation geht mit einer Zirkularisierung der RNA einher. Dabei interagieren die Motive am 5'-Ende des ORF (im C-Protein-Gen, 146-163 nt) mit dem 3'-Ende (im 3'-NCR, 10.750-10.766 nt), das zu einer Konformationsänderung und Zirkularisierung des Genoms führt [You und Padmanabhan, 1999; Corver et al., 2003].

Viele Fragen in der Flavivirus-Replikation sind noch offen, beispielsweise ist noch immer ungeklärt, inwieweit die zirkuläre Form des Genoms während der Replikation bestehen bleibt.

I.3 Der Impfstoff

Die Entwicklung des Gelbfieberimpfstoffes begann 1930 als Max Theiler und seine Kollegen den ersten attenuierten Gelbfieber-Stamm nach über 200 Passagierungen in Zellkultur erhalten hatten, wofür sie 1951 den Nobelpreis erhielten [Theiler und Smith, 1937]. Seit dem ist Theilers Impfstoffstamm, bekannt als 17D seit 1945 an über 400 Millionen Personen verabreicht worden und verursachte nur selten schwere Nebenwirkungen oder Tod und gilt damit als sehr sicher [Barrett, 1997, Monath, 1989, Monath, 2001].

Die erstmalige Impfung mit dem Lebendimpfstoff YFV-17D führt zu einer sehr schwachen Virämie ($\leq 10^2$ pfu/mL), die zwischen dem 3. und 7. Tag nach Impfung (dpv) detektierbar ist. Dabei kann aufgrund der geringen Virämie der Geimpften keine Transmission über Mosquitos stattfinden. Die protektive Immunität wird in >95 % der Geimpften induziert [Monath et al., 2002; Niedrig et al., 1999]. Neutralisierende Antikörper erscheinen in der Regel zwischen dem 7. und 10. Tag dpv. Nach einer einzigen Impfung, bewirkt der Impfstoff einen sehr guten Schutz, der Dekaden und möglicherweise lebenslang anhält, dennoch rät die WHO zur Impfauffrischung nach zehn Jahren [Monath et al., 2002; Monath, 1989; Groot und Riberiro, 1962; Poland et al., 1981]. Nach wiederholter Impfung tritt keine Virämie auf und die Reaktionen auf dem Impfstoff fallen noch geringer aus [Monath et al., 2002; Reinhardt et al., 1998].

Impfstoffe sollen mit einem großen Nutzen und mit einem geringen Risiko behaftet sein. Der Gelbfieberimpfstoff tut dies, indem er eine starke und lang anhaltende Immunantwort in Menschen mit geringem Risiko für die Empfänger hervorruft. Weniger bekannt sind die spezifischen T-Zellantworten. Die Gesamtzahl an CD8⁺ T-Zellen steigt in Geimpften an und virusspezifische CD8⁺ T-Zellantworten konnten bis 18 Monaten nach Impfung detektiert werden, was vermuten lässt, dass die CD8⁺ T-Zellen effektiv vom Impfstoff geprägt wurden [Co et al., 2002; van Der Most et al., 2000; Reinhardt et al., 1998; Kurane et al., 1995].

Der Preis für die effektive Immunität ist niedrig, so wie auch schwere Komplikationen selten sind. Seit 1945 kam es mit einer Rate von einem Fall pro

20 Millionen Empfängern, zu einer Enzephalitis nach Impfung, hauptsächlich in jungen Kindern. Um diese Fälle zu vermeiden, werden Kinder, die jünger als 9 Monate sind, nicht geimpft [Monath, 1989]. Weitere Kontraindikationen gelten, wie sie generell für Lebendimpfstoffe bestehen, einschließlich schwerer chronischer Krankheiten, Immundefizienzen oder immunsuppressive Therapien und Schwangerschaft. Da der Impfstoff in Hühnerembryonen hergestellt wird, sollten Personen mit einer Hühnereiweißallergie vorher auf Verträglichkeit getestet werden. Milde systemische Symptome (leichtes Fieber, Kopfschmerzen) kommen in ca. 5 % der Geimpften am 5. oder 6. Tag nach Impfung vor, sind aber selten hinderlich bei der Erledigung von Arbeitsaufgaben [Monath, 1989]. Obwohl der Impfstoff bis heute als einer der sichersten und effizientesten zählt, sind in den letzten zehn Jahren schwere Komplikationen von vor allem viszerotropen Fällen (YEL-AVD) aufgetreten, die einer Wildtyp-Gelbfieberinfektion gleichkamen [Vasconcelos et al., 2001; Martin et al., 2001; Centers for Disease Control 2002; Centers for Disease Control 1999; Centers for Disease Control 2001; Galler et al., 2001; Gerasimon und Lowry, 2005]. Vor allem ältere Personen über 60 Jahre scheinen ein erhöhtes Risiko zu haben an YEL-AVD zu erkranken, weswegen Massad et al. [2005] eine Kontraindikation für diese Personengruppe vorschlagen [Khromava et al., 2005]. Dies wird zurzeit jedoch nicht von allen empfohlen, da eine allgemeine Kontraindikation von über 60jährigen in bestimmten Situationen inadäquat sei [Martins et al., 2006]. Ein weiterer Risikofaktor scheint die Thymusdisfunktion zu sein, so dass auch hier zwischen Nutzen und Risiko einer Impfung abgewägt werden sollte [Barwick et al., 2004; Troillet und Laurencet 2001; Besuschio et al., 1976].

I.4 Molekulare Determinanten der Attenuierung

Attenuierte Viren unterscheiden sich von den Wildtyp-Stämmen hinsichtlich der Virulenz und Pathogenität, ähneln ihnen aber in Bezug auf Aufbau, Proteinzusammensetzung und Infektionsverhalten. Diese Viren verursachen zwar abgeschwächte Infektionen, können jedoch aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Wildtyp die Bildung neutralisierender Antikörper und zytotoxischer T-Zellen induzieren. Die von attenuierten Viren ausgelöste Immunantwort bietet daher einen lang anhaltenden Schutz vor Infektionen mit dem jeweiligen pathogenen Erreger.

Auf molekularer Ebene sind Mutationen im Genom der Wildtypviren für die Attenuierung verantwortlich. Die Untersuchungen zur Identifizierung der spezifischen Attenuierungsmutationen haben bei YFV die Vielzahl der Faktoren, die die Attenuierung beeinflussen, zu Tage gebracht. Vor allem die Sequenzvergleiche zwischen den verschiedenen YFV-Impfstoffstämmen und den Wildtyp-Stamm YFV-Asibi haben eine Anzahl von Substitutionen aufgezeigt, die zur Virusattenuierung beitragen könnten. Der Impfstoff YFV-17D unterscheidet sich in 31 Aminosäuren vom YFV-Asibi. 20 Substitutionen davon waren in allen drei YFV-17D Impfstoffstämmen (17D-204, 17D-213 und 17DD) vorzufinden, wovon wiederum nur 14 Änderungen im nichtkonservativen Bereich lagen. 12 von den ursprünglich 31 Substitutionen zwischen YFV-Asibi und YFV-17D sind im E-Protein vorzufinden [Hahn et al., 1987] und nachfolgende Studien haben die potenziellen Attenuierungsstellen auf 8 nicht-konservative Aminosäuren eingeschränkt [Galler et al., 1997]. Es ist bekannt, dass zwei Mutationen im E-Protein des YFV-17D-Impfstoffes das Virus zu einem neurovirulenten Phänotyp revertieren lassen [Jennings et al., 1994]. Weitere Experimente in der Zellkultur haben außerdem gezeigt, dass wenige Substitutionen ausreichen können um den Phänotyp des Virus zu verändern [Ryman et al., 1997; Ryman et al., 1998; Barrett et al., 1990b; Dunster et al., 1990].

I.5 Virale Vollängenklone

Virale Vollängenklone basieren auf dem vollständigen Genom von Viren, so dass die Virussequenzen für eine Reihe von gentechnischen Arbeiten leicht zugänglich sind. Das Vornehmen von Mutationen, sowie die Nutzung viraler Vollängenklone als Systeme zur Expression von Fremdproteinen in verschiedenen Zellkultursystemen werden dadurch gestattet. Racaniello und Baltimore [1981] zeigten erstmals anhand des Poliovirus, die Möglichkeit Viren von klonierter cDNA zu gewinnen. Die Herstellung von Vollängenklonen auf der Basis von RNA-Viren ist nun eine viel verwendete Routinemethode. Das virale RNA-Genom wird dabei vollständig in eine cDNA-Sequenz umgeschrieben, die dann unter Kontrolle eines geeigneten Promotors gebracht wird (z.B. den aus Bakteriophagen stammenden Promotoren SP6 und T7). SP6- bzw. T7-kontrollierte Vollängenklone müssen erst einer *in vitro*-Transkription unterzogen werden. Das hierdurch entstandene RNA-Transkript kann dann durch Transfektionen in die zu infizierende Zelle eingebracht werden, wo es als primäres Transkript für Translations- und

Replikationsprozesse dient und so neue Viren hervorgebracht werden können. Diese Anwendung ist eine moderne Validierung des Hershey-Chase-Experiments. Der Zugang zu spezifischen bakteriellen Restriktionsendonukleasen, DNA Ligasen und die Möglichkeiten der Mutagenese haben es möglich gemacht, infektiöse Klone zu manipulieren.

I.6 Immunologie

Werden die primären physischen wie chemischen Barrieren, wie z.B. Haut, Schleimabsonderungen, Tränen, saurer pH von Pathogenen durchbrochen, kommt das Immunsystem ins Spiel. Multifaktorielle Parameter der Wirts-Parasiten Interaktion sind sehr komplex und die Details können vielgestaltig sein. Zwei Immunmechanismen sind zu unterscheiden, die angeborene (nichtspezifische) und die erworbene (spezifische) Immunantwort. Dabei ist die erworbene Immunantwort ein zusätzlicher Schutzmechanismus, der nicht ohne das angeborene Immunsystem existieren kann und eng mit diesem verzahnt ist. Es wird angenommen, dass die Entscheidung auf ein Antigen zu reagieren im wesentlichen durch das angeborene Immunsystem erfolgt [Janeway und Medzhitov, 2002].

I.6.1 Th-Zellen und Zytokine

T-Lymphozyten differenzieren in zwei Subpopulationen, die T-Helfer 1 (TH1)- und T-Helfer 2 (TH2)-Zellen, mit denen das Immunsystem in der Lage ist, intrazelluläre (TH1) und extrazelluläre (TH2) Pathogene zu vernichten. 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. Zytokine sind eine heterogene Gruppe von löslichen Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht (ca. 20 kDa), die als humorale Mediatoren in der interzellulären Kommunikation während der antiviralen Verteidigung im Immun- und Nervensystem wichtige Aufgaben übernehmen. Ihre Anwesenheit ist einer der ersten Indikatoren, dass der Wirt infiziert worden ist. TH-Zellen sind an vielen Stellen involviert, insbesondere in die adaptive Immunreaktion. Sie kontrollieren beispielsweise zum großen Teil die Antikörperproduktion durch B-Zellen, nehmen wichtigen Einfluss auf CD8⁺-T-Zellen und beeinflussen die verschiedenen Leukozytenpopulationen (Granulozyten, Eosinophile und Makrophagen) entscheidend.

Die beiden TH-Zellpopulationen unterscheiden sich im Muster der von ihnen produzierten Zytokine [Mosmann et al., 1986]. Dabei wurden TH1 Zellen als Interleukin-2 (IL-2), IL-3 und Interferon IFN- γ produzierende und TH2 als IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzierende Zellen definiert. Seit dem sind viele Zytokine den beiden Subpopulationen zugeordnet worden [Rengarajan et al., 2000; Liew, 2002; Seder und Paul, 1994]. Aktuell gilt IFN- γ als das TH1 definierende und IL-4 als das TH2 definierende Zytokin. GM-CSF kann von beiden Th-Zelltypen exprimiert werden. Weitere Zytokine können nicht immer eindeutig zugeordnet werden. Völlig unbestritten ist jedoch, dass die Entwicklung zur TH1 bzw. TH2 Zelle nicht prädestiniert ist, sondern beide Phänotypen Polarisations-Endpunkte darstellen, die sich aus naiven TH-Zellen entwickeln [Jankovic et al., 2001]. Die Entscheidung, ob TH1- oder TH2-Zellen gebildet werden, besitzt weit reichende Konsequenzen für den Verlauf einer Erkrankung mit pathogenen Organismen. Die TH1-/TH2-Differenzierung wird neben anderen Faktoren durch die Interaktion mit anderen Zellen, speziell über den TCR-MHC-Komplex, beeinflusst. Die Einteilung der TH-Zellen dient aber nicht nur der Beschreibung ihrer Zytokinausschüttung, sondern ist auch mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften der TH-Zellen in vivo assoziiert. TH1 und TH2 Zellen greifen auf unterschiedliche Art und Weise in das Immunsystem ein und können somit den Ausgang einer Immunantwort entscheidend mit beeinflussen [Abbas et al., 1996; Mosmann und Coffman, 1989; Sadick et al., 1986].

Zelluläre und inflammatorische Immunreaktionen phagozytischer Zellen werden vor allem durch TH1-Zytokine verstärkt. So induziert IFN- γ in Makrophagen die Produktion weiterer Zytokine (u.a. IL-12 und TNF- α), die der effektiven Bekämpfung von intrazellulären Parasiten dienen [Sadick et al., 1986, Anggard, 1994, Heinzel et al., 1991]. Außerdem exprimieren IFN- γ aktivierte Makrophagen verstärkt MHC-II, das eine verbesserte Antigenpräsentation ermöglicht.

TH2 Zytokine induzieren dagegen humorale Immunreaktionen. Diese sind durch die Rekrutierung von Eosinophilen und Mastzellen und die Aktivierung von B-Zellen und damit die Produktion von Antikörpern gekennzeichnet. TH2-Antworten spielen u.a. eine zentrale Rolle bei der Abwehr von extrazellulären Erregern.

In Tabelle I.2 sind die in dieser Arbeit hauptsächlich vorkommenden Zytokine in ihrer Funktion beschrieben.

TABELLE I.2:
Funktion der in dieser Arbeit hauptsächlich vorkommenden Zytokine

	Produzierende Zellen	Funktion
GM-CSF	T-Zelle, Makrophagen Fibroblasten, Endothelzellen	Induziert myelomonozytisches Zellwachstum und Differenzierung
GRO	Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten	aktiviert Neutrophile, induziert Chemotaxis, Exozytose
IL-1ra	Makrophagen	IL-1 Rezeptor Antagonist, wirkt als natürlicher Antagonist der IL-1-Funktion, Fieber, T-Zellaktivierung, Makrophagenaktivierung
IL-2	T-Zelle	Induziert Proliferation von T-Zellen, stimuliert Wachstum und zytolytische Funktion von NK-Zellen, induziert AK-Synthese in B-Zellen
IL-3	Th-Zelle	Kolonie-stimulierender Faktor mehrerer Abstammungslinien, stimuliert Wachstum und Differenzierung von Vorläuferzellen im Knochenmark, teilt viele Aktivitäten mit IL-4
IL-4	Mastzellen, Knochenmark	Induziert B-Zellproliferation und Differenzierung, benötigt für IgE-Produktion, inhibiert Makrophagen Produktion, blockiert Effekte von IFN- γ auf Makrophagen, stimuliert Wachstum und Differenzierung von Th2-Zellen, stimuliert Expression von Adhäsionsmolekülen auf das vaskuläre Endothelium [Snapper und Paul, 1987, Wills-Karp, 1999, Paul, 1991, Romagnani 1994]
IL-5	Th2-Zellen	Induziert B-Zell-Differenzierung mit IL-2 und IL-4, steigert die Expression von eosinophilen Zerstörungsfunktionen [Wardlaw et al., 1995, Collins et al., 1995]
IL-6	Makrophagen, T-Zelle, Vaskuläre Endothelzellen, Fibroblasten	Produziert in Antwort auf IL-1 und TNF, stimuliert B-Zell Wachstum, Co-Stimulator für T-Zellen, stimuliert Hepatozyten Akut-Phasen-Proteine zu synthetisieren
IL-8	Makrophagen	Chemotaktisches Molekül für neutrophile Zellen und T-Zellen
IL-10	T- und B-Zellen	Fördert Wachstum und Differenzierung von B-Zellen, inhibiert Makrophagen-Funktion
IL-13	T-Zellen	Wachstum und Differenzierung der B-Zellen, hemmt die Produktion inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen
INF-γ	T-Zelle, NK-Zelle	Aktiviert Makrophagen, begünstigt Adhäsion von Th-Zellen an das vaskuläre Endothelium [Sadick et al., 1986, Anggard, 1994, Heinzel et al., 1991].
IP10	Monozyten, Endothelzellen, Keratinocytes, Fibroblasten	Chemotaktisches Molekül für Th1-Lymphozyten, und Monozyten,
MCP-1	Makrophagen, Monozyten, T-Zelle, Endothelium, glatter Muskel, Keratinocytes, Fibroblasten	Induziert Monozyten-Chemotaxis
MIG	Makrophagen	Chemotaktisches Molekül für Monozyten, Lymphozyten und einige T-Zellen
RANTES	T-Zelle, Thrombozyten	Chemoattraktant für T-Zellen, Monozyten und Eosinophile
TNF-α	T-Zelle, Makrophage	Aktiviert Neutrophile, induziert inflammatorische Antwort und Fieber und initiiert Muskel- und Fett-Katabolismus (Cachexia), induziert Adhäsion von Th-Zellen an das vaskuläre Endothelium, ermöglicht Lysis einiger virusinfizierter Zellen
TNF-β	T-Zellen, B-Zellen	Endothelaktivierung, Abtöten verschiedenster Zellen, Entzündungsreaktionen

I.7 Ziele der Dissertation

In der vorliegenden Arbeit soll die Immunantwort nach Gelbfieberinfektion bzw. -impfung näher charakterisiert werden. Dabei sollen die Mechanismen, die zum einen zu einer lang anhaltenden Immunität führen und zum anderen zu Impfwischenfällen führen, durch vergleichende Studien eingehender untersucht werden.

In einem zweiten Teil soll nach ursächlichen Mutationen für die Abschwächung des YFV gesucht werden. Die Arbeit gliedert sich in drei Bereiche:

- Optimierung der einzusetzenden Nachweismethoden für YFV.

- Aus der vergleichenden Untersuchung von YFV-Infizierten, YFV-Geimpften und YFV-Impfwischenfällen sollen hinsichtlich ihrer Immunantwort und Analyse der YFV-Sequenz charakteristische Kenngrößen für einen fatalen oder einen zur dauerhaften Immunisierung führenden Infektionsverlauf ermittelt werden. Diese sollen sowohl Impfwischenfälle besser einordnen als auch YFV-Wildstämme besser charakterisieren lassen.

- YFV-Stämme aus akuten Fällen und Impfwischenfällen sollen in ihrer Nukleotidsequenz analysiert und mit vorhandenen Daten verglichen werden. Durch gezielte Mutagenesestudien, mit dem Ziel ursächliche Mutationen für die Attenuierung für YFV-17D zu finden, sollen diese Daten ergänzt werden.