

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Immunantwort nach Gelbfieberinfektion bzw. -impfung näher untersucht. Aus der vergleichenden Analyse der Immunantwort von YFV-infizierten- (YFV_{Inf}), YFV-geimpften Personen (Impflinge) und YFV-Impfzwischenfällen (YEL-AE) sollten Unterschiede für einen fatalen oder einen zur erfolgreichen Immunisierung führenden Infektionsverlauf ermittelt werden. Hierfür war es erforderlich, spezifische Nachweismethoden für YFV zu entwickeln und zu optimieren.

Des Weiteren wurden Mutationen, die für die Abschwächung des YFV verantwortlich sein könnten, mit Hilfe von infektiösen Klonen näher untersucht. Die Sequenzvergleiche der YFV-Stämme aus akuten Fällen und Impfzwischenfällen wurden dabei durch gezielte Mutagenesestudien ergänzt, mit dem Ziel, ursächliche Mutationen für die Attenuierung des YFV 17D zu finden.

IV.1 Nachweis von YFV

Schnelle und zuverlässige diagnostische Verfahren sind für den Nachweis von Viren notwendig, um entsprechend auf die Virusinfektion reagieren zu können. Direkte Verfahren, wie zellkulturbasierte Methoden erfordern einen hohen Zeitaufwand und sind in der Routine aufwändig [Porterfield, 1959; Monath und Nystrom, 1984; de Brito et al., 1992]. Der YFV-Nachweis auf Antikörperebene ist auf Grund der Antikörper-Kreuzreaktivität innerhalb der Flaviviren schwierig zu interpretieren. Andere Flavivirusinfektionen können mit klinischen oder epidemiologischen Daten nicht unbedingt voneinander unterschieden werden [Schlesinger et al., 1983].

Die Detektion von YFV-RNA durch die PCR im menschlichen Serum oder Plasma weist eher auf eine akute YFV-Infektion hin [Tanaka, 1993; Chang et al., 1994; Deubel et al., 1997; Drosten et al., 2002; Bae et al., 2003]. Durch die Einführung der PCR sind auch in der Virologie sensitive und schnelle Methoden verfügbar, die eine qualitative und quantitative Aussage ermöglichen [Niesters, 2001]. Die TaqMan-PCR ist ein „real-time“ Assay, der einen YFV-Nachweis in weniger als 3 Stunden von der Probenaufbereitung bis zum Endergebnis erbringen kann. Dieser Test ist in einem linearen Detektionsbereich sehr sensitiv (10^1 bis 10^8 Genomäquivalente GE/Reaktion) und kann reproduzierbar quantifizieren [Bae et al., 2003].

In dieser Arbeit wurden zwei unabhängige Assays entwickelt und optimiert, die bei unterschiedlicher Amplikonlänge (104 vs. 228 bp) einen sehr ähnlichen Detektionsbereich aufweisen. Eine erhöhte Variation im niedrigen Konzentrationsbereich, nah am Detektionslimit ist ausschließlich durch die statistische Verteilung der nachzuweisenden DNA in der Probe verursacht [De Vries et al., 1999]. Die PCR-Effizienz ist mit 98,7 % sehr hoch und die Streuung um den experimentellen Mittelwert beträgt weniger als 30%. Selbst nahe dem Detektionslimit ist die Präzision von unter 45% gut, vor allem, wenn man die verschiedenen den Gesamtfehler bedingenden Arbeitsschritte wie RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR berücksichtigt. Beide hier etablierten TaqMan-Assays sind vergleichbar und detektieren in dem NS3- und NS5/3'UTR-Genombereich.

Für eine absolute Quantifizierung ist eine Standardkurve erforderlich. Obwohl eine externe Kalibrierung wegen unkontrollierter „inter-tube“-Variationen nicht perfekt quantitativ ist [Mackay et al., 2002], wurde diese der internen Kalibrierung bevorzugt, da diese wiederum das Detektionslimit beeinflussen und so das diagnostische Potenzial der TaqMan-PCR reduzieren kann.

Wenn YFV-infizierte Zellen mit der TaqMan-PCR untersucht werden, ist es sinnvoll, geeignete Referenzgene zur Normalisierung der TaqMan-PCR-Daten mitzuführen. Um die nachgewiesenen YFV-GE einer infizierten Zellkultur miteinander vergleichen zu können, wurden diese mit zellulär konstitutiv exprimierten Genen verglichen. Konstitutiv exprimierte Gene („Housekeeping“-Gene, z.B. β -Aktin) dienen zur Normalisierung verschiedener Proben, um die experimentellen Unterschiede, begründet beispielsweise durch Abweichungen in Probenbeladung und Reaktionseffizienz, zu berücksichtigen [Sturzenbaum und Kille 2001]. In den hier durchgeführten Untersuchungen haben sich Hinweise ergeben, dass viele der genutzten Referenzgene, wie β -Aktin, nicht die optimalen Kontrollen in der mRNA Expressionsanalyse für alle Zellen darstellen, obwohl diese häufig eingesetzt werden [Glare et al., 2002; Selvey et al., 2001; Zhong et al., 1999]. Diese Hinweise wurden vor kurzem auch für virusinfizierte Zellen näher untersucht. In dieser Untersuchung wurden zehn potenzielle Referenzgene in verschiedenen Zelllinien, die mit unterschiedlichen Viren, u.a. mit YFV, infiziert wurden, verglichen [Radonic et al., 2005]. Hier konnte gezeigt werden, dass sich die Gene L13, TBP und PPI besser als β -Aktin für Referenzzwecke YFV-infizierter

Zellen eignen. Sie wurden während des Verlaufes der Virusreplikation in den untersuchten Zelllinien stabil exprimiert und können somit im Vergleich zu β -Aktin als besser geeignete Referenzgene für YFV-infizierte Zellen angesehen werden. Um die Vergleichbarkeit zu früheren Experimenten in dieser Arbeit und zu Experimenten anderer Arbeiten zu gewährleisten, wurden die Messungen mit β -Aktin dennoch durchgeführt. Aktin wird als universell einsetzbares Referenzgen beschrieben und in vielen Untersuchungen als interne Kontrolle eingesetzt [Sturzenbaum und Kille 2001, Mill et al., 2002, Gorski et al., 2003]. Auf Grund der Ergebnisse von Radonic et al. [2005] kann man feststellen, dass β -Aktin nicht für alle Zellkulturlinien ein im gleichen Maße gutes Referenzgen ist und dass in Vorversuchen daher ein Referenzgen-Spektrum für die jeweils einzusetzenden Zellkultursysteme geprüft werden sollte. Sinnvoll wäre der Einsatz mehrerer Referenzgensysteme. Radonic et al. [2005] haben bereits die Gene L13, TBP und PPI etabliert, die für die Zellkulturlinien, in denen sich YFV vermehren lässt, geeignet erscheinen. Weitere Referenzgene könnten über Microarray-Datensätze von menschlichen Zelllinien ermittelt werden [Boes und Neuhauser, 2005]. Nach der Auswahl geeigneter Referenzgene sollten diese für die Quantifizierung mittels TaqMan-PCR sehr gut verwendbar sein.

Um die Sensitivität und Spezifität der TaqMan-PCR für klinische Proben zu untersuchen, ist eine größere Probenanzahl nötig. Die Detektion von YFV im Blut ist vom Infektionsverlauf abhängig, da im Blut von Impfungen nur für kurze Zeit Virus nachweisbar ist. In den hier untersuchten akuten Fällen wurde das YFV über längere Zeit in hohen Konzentrationen ins Blut ausgeschieden, aber auch hier ist eine größere Probenanzahl nötig, um relevante Aussagen treffen zu können. Nach den hier gewonnenen Erkenntnissen ist die TaqMan-PCR sehr gut für die Detektion von YFV bei akuten Fällen und für die Quantifizierung der Viruslast geeignet.

Ein Nachteil der PCR in der Virusdiagnostik war bisher die fehlende Korrelation zwischen der viralen Nukleinsäuredetektion und der Detektion infektiöser Partikel, die nur durch die aufwändigere Viruskultivierung in Zellen möglich ist. In einem Vergleich der YFV-GE (mittels TaqMan-PCR), mit Konzentrationen infektiöser YFV (mittels Plaque Test) ergaben sich 1000-5000fach höhere Werte für die TaqMan-PCR verglichen mit der Anzahl an infektiösen Partikeln. Diese Differenz könnte

auf der Produktion von defekten nicht-infektiösen Partikeln, wie dies auch für HCV gezeigt werden konnte, beruhen [Pawlotsky et al., 2000]. In dieser Gegenüberstellung variiert das Ausmaß der Produktion defekter Partikel je nach Virusart. Die in dieser Arbeit durchgeführte Pearson-Analyse konnte dabei eine signifikante Korrelation zwischen Genomäquivalenten und Plaque Anzahl aufzeigen ($R=0,88$, $P<0,0001$).

Da die PCR nur die Nukleinsäure, aber nicht das infektiöse Potenzial eines Virus detektieren kann, sind beide Methoden erforderlich, um konkrete Aussagen zum Infektionsverlauf treffen zu können. Auf Grund der schnelleren und präziseren Ergebnisse hat die PCR in der Diagnostik von akuten YFV-Infektionen, wie auch die letzten Fälle gezeigt haben [Colebunders et al., 2002, Bae et al., 2005], eine entscheidende Rolle in der Diagnostik eingenommen, auch wenn sie die Virusisolation für die Charakterisierung des YFV-Isolates nicht ersetzen kann.

Mit dieser Arbeit wurden wesentliche Verbesserungen für zukünftige Studien erarbeitet, die auf der Detektion von YFV-RNA beruhen. Mit der hier erstmals entwickelten TaqMan-PCR ist eine Quantifizierung von mit YFV enthaltenden Proben mit hoher Genauigkeit möglich. Für die Normalisierung in infizierten Zellkulturen wurden drei Referenzgene ermittelt (L13, TBP und PPI), die in den YFV relevanten Geweben oder Zellen im Gegensatz zum bisherigen Referenzgen β -Aktin auf einem stabileren Niveau exprimiert werden.

IV.2 Vergleich des YFV-Infektionsverlaufes bei YFV_{Inf}, Impfungen und YEL-AE

YF ist eine schwere Infektionskrankheit, die durch das YFV hervorgerufen wird [Monath und Barrett, 2003; Monath und Heinz, 1996; WHO, 1998]. Wie auch die YFV-Ausbrüche der letzten Zeit belegen [Vasconcelos et al., 2001; Martin et al., 2001; Centers for Disease Control 2002; Centers for Disease Control 2001a; Centers for Disease Control 2001b; Galler et al., 2001; Gerasimon und Lowry, 2005], haben YFV-Infektionen, abhängig von der jeweiligen Variante, überwiegend schwere Krankheitsverläufe, die zu 20 bis 50 % fatal enden.

Die Ausbildung und Manifestation einer YF-Symptomatik, verursacht durch das YFV, können unterschiedliche Ursachen haben. Normalerweise sind YFV-Infektionen des Menschen auf YFV-infizierte Mücken zurückzuführen. Daneben gibt es das selten auftretende Phänomen (2 bis 5 YEL-AE pro Million verabreichter Impfdosen), dass Impflinge unterschiedlich schwere Ausprägungen der YF-Symptomatik 3-9 Tage nach Impfung (dpv) zeigen. Die Ursache dieser neurotrophen oder viszerotropen Impfwischenfälle (YEL-AND bzw. YEL-AVD) ist bisher nicht geklärt und Gegenstand weiterer Untersuchungen. Nach der Virämie, die mit Fieber, Kopfschmerzen, Schüttelfrost und Übelkeit einhergeht, zeichnen sich YEL-AE-Fälle je nach Schweregrad vor allem durch Ikterus, Albuminurie, Oligurie, Atemnot, Blutungen, Muskel- und Gelenkschmerzen aus.

Um ein besseres Verständnis für das Zustandekommen dieser YEL-AE zu erhalten, wurden in dieser Arbeit die Charakteristiken von Wildtypinfektionen (YFV_{Inf}) mit denen der YEL-AEs verglichen. Außerdem wurden geimpfte Personen ohne YEL-AE (Impflinge) als weitere Vergleichsgruppe herangezogen. Es wurden klinische Daten, Virustiter, Sequenzdaten und neutralisierende Antikörper von Impfungen, von YEL-AE und von YFV_{Inf} untersucht und miteinander verglichen.

Nach Impfung mit dem attenuierten YFV-Impfstoff kommt es bei der überwiegenden Zahl der geimpften Personen zu einer sehr milden subklinischen Virämie, die in eine persistente T-Helfer-zellabhängige Antikörperantwort mit langanhaltender Immunität mündet [Freestone, 1994; Monath, 1999; Poland et al., 1981]. So traten auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Impfungen keine nennenswerten YFV-spezifischen Symptome oder Nebenwirkungen auf und es

waren auch keine pathologischen Befunde in der Gruppe der Impflinge zu beobachten gewesen.

Bei den zwei hier untersuchten importierten YFV_{Inf}, wie auch bei den YEL-AVD mit fatalem Ausgang (YEL-AVD_{Fat}) traten spezifische Symptome einer hämorrhagischen Fieberinfektion wie bereits beschrieben auf [Monath und Barrett 2003; de Filippis et al., 2002; MMWR, 2002]. Bei all diesen Fällen ist die Leber das Zielorgan der YFV mit einer massiven Vermehrung von YFV in den Hepatozyten, die eine schwere Hepatitis mit vollständiger Organzerstörung nach sich zog und damit für die primären Symptome verantwortlich ist [Marianneau et al., 1998, Vieira et al., 1983]. Die Lebergewebe der hier untersuchten YFV_{Inf} und YEL-AVD_{Fat} wiesen typische pathologische Merkmale einer Leberzerstörung auf, was in den histologischen Untersuchungen in Kooperation mit Stefan Pest (Charité Berlin) bestätigt wurde. Die starke Erhöhung der untersuchten Transaminasen (Leberenzyme) wie Aspartat Aminotransferase (AST) und Alanin Aminotransferase (ALT) im Plasma indiziert sowohl bei YFV_{Inf} als auch bei YEL-AVD_{FAT} die Zerstörung der Leberzellen [Teichmann et al., 1999; Colebunders et al., 2002].

Das massive Vorkommen von YFV konnte durch die TaqMan-PCR sowohl bei den hier untersuchten YFV_{Inf} als auch bei dem YEL-AVD_{Fat} nachgewiesen werden. Dabei konnten alle positiven Erst-Befunde der TaqMan-PCR in einem zweiten Durchlauf bestätigt werden. Eine erste YFV-Diagnose mit dieser hier etablierten Nukleinsäuretechnik ist zuverlässig, schnell und sensitiv. In Leber und Niere konnten hohe Titer von $2,4 \times 10^6$ bis zu $6,2 \times 10^9$ GE/g Gewebe von YFV mittels TaqMan-PCR detektiert werden und bestätigten den pathologischen (klinische Daten, Immunhistologie) und mikroskopischen (EM, IF) Befund. Die TaqMan-PCR lieferte keine falsch-positiven und keine falsch-negativen Ergebnisse. Bei den Impflingen konnte innerhalb der Virämie YFV-RNA im peripheren Blut mit der TaqMan-PCR detektiert werden. Da nach einer Impfung die Virustiter jedoch gering bleiben, konnte bei dieser Gruppe selbst nach Konzentrierung der Proben kein Virus mit dem EM nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze für die EM beträgt ca. 10^6 Partikel/mL und ist daher nur für hochtitrige Proben geeignet. Bei den Serumproben von YEL-AEs konnte nicht immer Virus durch die TaqMan-PCR nachgewiesen werden. Da die Virämie wahrscheinlich bei diesen YEL-AEs denen

der Impflinge ähnlicher ist als die der YFV_{Inf}, ist eine Detektion auf Nukleinsäureebene nur in der kurzen virämischen Phase möglich. Da die Probenentnahmen von YEL-AEs aber nicht immer in diesem Zeitfenster liegen, ist die TaqMan-PCR in diesen Fällen nicht immer erfolgreich. Der Plaquetest ist in diesen Fällen den gleichen Limitationen unterworfen, jedoch kann der Neutralisationstest nach erfolgreicher Immunisierung ca. zehn Tage nach Impfung zur Detektion der neutralisierenden Antikörper herangezogen werden. Während die TaqMan-PCR für die YFV-Diagnostik in der Virämie geeignet ist, ist nach der Virämie der Neutralisationstest für eine YFV-Diagnostik besser geeignet. Die Virusanzucht und nachfolgende Virusisolierung ist vor allem bei geringtitrigen Proben eine Möglichkeit, Virus in großem Maßstab anzureichern. Im Prinzip reicht dabei ein Virus aus, um es in der Zellkultur zu vermehren und in anschließenden Tests (PCR, IF, EM) zu detektieren. Die Virusisolierung wurde als zusätzliche diagnostische Methode zur PCR durchgeführt und es gelang sowohl in den beiden importierten YFV_{Inf} mit fatalem Ausgang (IvoryC1999 und Gambia2001) als auch bei dem YEL-AVD mit fatalem Ausgang, YFV zu isolieren. Diese Virusisolate wurden zur weiteren Charakterisierung sequenziert.

Das hier etablierte Primerset zur Ermittlung der Sequenzen über das ganze YFV-Genom erlaubt die schnelle Identifizierung und Charakterisierung der Virusstämme von YFV-Fällen.

Die zwei Wildtyp-Isolate wurden komplett sequenziert und die Sequenz mit anderen in der Genbank vorhandenen YFV-Sequenzen verglichen. Dabei ließen sich die Isolate in den West Afrika II-Genotyp einordnen [Bae et al., 2005], während ein früherer IvoryC82 Stamm, der die Epidemie 1982 in der Elfenbeinküste verursachte, zum West Afrika I-Genotyp eingeordnet wurde. Dies lässt vermuten, dass sich das Virus entweder in dieser Region verändert hat oder dass IvoryC1999 durch Reiseverkehr importiert wurde. Wenn man die Stabilität dieses RNA-Virus berücksichtigt [Trent et al., 1981, 1983; Monath et al., 1983], scheint Letzteres eher der Fall gewesen zu sein, zumal die Homologie zwischen IvoryC82 und IvoryC1999 nur 91% beträgt.

Der YEL-AVD_{Fat} zeigte wie oben beschrieben alle Charakteristika einer YFV-Infektion auf. Der Beginn der Symptome 2 bis 5 Tage nach Impfung spricht für einen Zusammenhang mit dem YFV-Impfstoff. Die vollständige Sequenzanalyse zeigte, dass das attenuierte YFV nach Impfung jedoch nicht zum YFV-Wildtyp zurückmutiert war. Es ereigneten sich nur zwei Mutationen innerhalb des ganzen

YFV-Genoms, die jedoch zu keinem Aminosäureaustausch führten. Der schwere Verlauf der Infektion mit fatalem Ausgang ist somit nicht durch ein verändertes Virus ausgelöst worden. Nach wie vor handelte es sich in diesem YEL-AVD um den attenuierten Impfstamm. Auch in anderen Fällen konnte YFV 17D bei Patienten mit typischer, einer Wildtypinfektion ähnlichen YF-Symptomatik und Histopathologie isoliert und zum Teil sequenziert werden, wobei keine relevanten Mutationen gegenüber dem verwendeten Impfstoffstamm festgestellt werden konnte [Galler et al., 2001]. Daher ist anzunehmen, dass der Impfwischenfall durch andere individuelle wirtsspezifische Eigenschaften ausgelöst wurde.

Serologische Untersuchungen, um YFV-spezifische IgM oder IgG Antikörper durch Immunfluoreszenz, ELISA oder Neutralisationstest zu detektieren, schlugen bei den YFV_{Inf} mit fatalem Ausgang fehl. Die YFV_{Inf} verstarben 5 bis 7 Tage nach Auftreten der ersten Symptome. Eine humorale Immunantwort vor ihrem Tod konnte nicht mehr generiert werden. Bei YEL-AVDs wie auch bei den Impfungen waren dagegen die serologischen Untersuchungen möglich. Bei dem YEL-AVD_{Fat} konnten im Gegensatz zu den beiden YFV_{Inf} mit fatalem Ausgang spezifische anti-YFV IgM, aber kein IgG mittels IFA nachgewiesen werden. Interessanterweise entwickelte der YEL-AVD_{Fat} einen im Vergleich recht hohen NT-Titer von 1:512. Wie es zu diesem Phänomen kommt und ob für den tödlichen Ausgang immunverstärkende Antikörper eine Rolle spielen, wie bei Dengue Virusinfektionen diskutiert, bleibt unklar [Schlesinger und Brandriss, 1983, Halstead 2003, Halstead 2006].

Hier wurden Impflinge mit YFV_{Inf} und YEL-AEs miteinander verglichen. Die klinischen Daten, der Virustiter und die neutralisierenden Antikörper zeigen, dass Personen mit YFV_{Inf} und YEL-AEs mit fatalem Ausgang ein sehr ähnliches Bild aufweisen und kaum voneinander zu unterscheiden sind. YEL-AEs mit nichtfatalem Ausgang schwanken in ihrer Manifestation. Worin das Zustandekommen und die unterschiedliche Ausprägung der YEL-AEs begründet ist, kann durch die oben durchgeführten Untersuchungen nicht geklärt werden. Eine Rückmutation des Impf- zum Wildtypvirus kann auf Grund der hier durchgeführten Sequenzdaten 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. Bis heute ist der Ablauf der zellulären Immunantwort nicht ausreichend geklärt. Der virale Einfluss auf das Immunsystem und die Aktivierung der Immunantwort hinsichtlich der Zytokinproduktion wurden daher im folgenden Abschnitt näher beleuchtet.

IV.3 Vergleich der Zytokinausschüttung nach YFV-Infektion bei YFV_{Inf}, Impfungen und YEL-AE

Die Aktivierung des Immunsystems und die Ausschüttung der Zytokine könnten in der ersten Phase der Immunantwort für das Fieber und die nichtspezifischen Symptome verantwortlich sein. Man weiß von Impfungen, dass sie eine transiente und schwache Virämie durchlaufen, die von geringfügig erhöhten T-Zellaktivierungsmarkern (Neopterin und β 2-Microglobulin) und erhöhten Werten von TNF- α , IL-6 und IL-1RA begleitet sind [Reinhardt et al., 1998; Hacker et al., 1998]. Um einen weiteren Einblick in die humorale und vor allem in die zelluläre Immunantwort zu erhalten, wurden die Zytokine von YFV_{Inf}, von Impfungen und von YEL-AE untersucht und miteinander verglichen. Die Methoden, die dabei zur Detektion der Zytokine zum Einsatz kamen, unterschieden sich hinsichtlich der Detektionsebene. Sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Proteinebene wurden die Zytokine detektiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den geimpften Personen auch klinische Proben untersucht, um die Datenbasis zu vergrößern und auch einen Vergleich zu YFV_{Inf} wie auch zu YEL-AE mit fatalem und nichtfatalem Ausgang zu ermöglichen. Auf diese Art und Weise wurde das untersuchte Kollektiv um die Wildtyp- und Impfwisfenfälle erweitert und die Vergleichsbasis somit vergrößert.

Erste Proben wurden anfangs mit einem ELISA analysiert. Da dieser jedoch ein viel größeres Probenvolumen erfordert, wurde zunächst die quantitative TaqMan-PCR als Methode der Wahl eingesetzt, um die Zytokin-Expression auf mRNA-Niveau zu messen. Die Messung der Zytokine auf mRNA-Ebene hat den Nachteil, dass nur Aussagen über die Induktion der Transkripte getroffen werden können. Posttranskriptionelle Modifikationen und Modulationen der Aktivität werden nicht berücksichtigt.

Im Laufe der Arbeit wurde eine neue Möglichkeit der Zytokinmessung mit geringem Probenvolumen berücksichtigt. Die Analyse des Zytokinprofils der YFV_{Inf} bzw. Impfungen wurde mittels eines kommerziellen semiquantitativen humanen Antikörper-Zytokinarray (RayBiotech) durchgeführt, der neben der TaqMan-PCR Auskunft auf Proteinebene ermöglichte. Der humane Zytokinarray ist für die Erstellung eines Zytokinprofils gut geeignet, da er eine Vielzahl von Zytokinen auf Proteinebene und bei geringem Probenvolumen erfasst. Mit dem Zytokinarray kann der Verlauf der Zytokinantwort nach YFV-Infektion bzw. –

Impfung im Vergleich zu allen anderen Methoden umfassend und semiquantitativ bestimmt werden und erlaubt eine kostengünstige und schnelle Analyse.

Die Virämie zwischen dem dritten und siebten Tag nach Impfung in Erstgeimpften ist assoziiert mit einer Erhöhung von IFN- α , TNF- α und von unspezifischen Infektionsmarkern der T-Zellaktivierung wie Neopterin und β 2-Mikroglobulin [Wheelock and Sibley, 1965, Monath et al., 2002, Hacker et al., 1998, Reinhardt et al., 1998]. Bezüglich der weiteren nachgewiesenen Zytokine in YEL-AVD-Personen lassen sich einige Hypothesen aufstellen.

In dieser Arbeit wurden sowohl in YFV_{Inf} als auch in YEL-AVD hohe Konzentrationen von IL-6 gefunden, das die Ausschüttung des Akut-Phasen-Proteins einschließlich des Fibrinogens, das in Koagulationsprozessen beteiligt ist, stimuliert. IL-6 gilt als einer der Hauptmediatoren einer systemischen inflammatorischen Reaktion [Akira et al., 1990] und steigert die endotheliale Permeabilität durch die Ausschüttung von endothelialen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) [Maruo et al., 1992]. Eine Überproduktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 kann zu einem gestörten Gleichgewicht der inflammatorischen Prozesse führen [Pinsky et al., 1993] und würde das Bild einer hämorrhagischen YFV-Infektion stützen. Auch eine Erhöhung von IL-8 und GRO, welche zu den Chemoattraktanten für neutrophile Granulozyten gelten, wurden in YEL-AVD vorgefunden. IL-8, welches zudem auch in hohen Konzentrationen in YFV_{Inf} vorzufinden war, löst eine starke Adhäsion der Monozyten an das aktivierte Endothelium aus, was eine potenzielle Rolle in der Monozyten-Rekrutierung spielen könnte. Der Austritt von Plasmaproteinen aus Gefäßen in das Gewebe (Extravasation) von aktivierten infizierten Monozyten mag ein Mechanismus für YFV sein, um sich über den Blutstrom in die Organe auszubreiten. Dieser Weg der Virusausbreitung ist auch bei anderen hämorrhagischen Fiebertoren, wie z.B. bei Ebola beschrieben worden [Villinger et al., 1999]. Die Überproduktion sowohl von proinflammatorischen (z.B. IL-6, IL-8, TNF, MCP-1) wie auch antiinflammatorischen (IL-1ra, IL-10) Zytokinen könnte für das Bild der YFV-Pathogenese eine Rolle spielen und möglicherweise im Zusammenhang mit der Stärke der Erkrankung stehen. Ähnliches ist für YFV verwandte Viren, wie bei Denguevirusinfektion beschrieben worden [Green et al., 1999].

Sowohl MCP-1 als auch RANTES können die vaskuläre Durchlässigkeit durch die Induktion der Ausschüttung von Superoxid-Radikalen und Histaminen

beeinflussen. MCP-1 und MCP-2 sind monozyten-chemoattraktante Proteine, die von Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen produziert werden und an der Rekrutierung von Makrophagen und T-Zellen an den Infektionsherd beteiligt sind [Lu et al., 1998]. Bisset et al. [1997] vermuten eine Korrelation zwischen viraler Replikation und MCP-1-Konzentrationen in HIV-Patienten. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen ebenfalls eine Erhöhung von MCP-1 in YFV_{Inf} und YEL-AVD_{Fat}, was auch in Bezug zu der hohen YFV-Replikation in diesen Fällen stehen kann. YFV können auch in Makrophagen replizieren [Barros et al., 2004, Liprandi and Walder, 1983], so dass es vorstellbar ist, dass YFV die chemotaktischen Eigenschaften von diesen und anderen Chemokinen für die eigene Vermehrung in dem Wirt ausnutzen kann. RANTES beeinflusst die Thrombozyten-Funktion durch die Ausschüttung von Arachidonsäure [Thomson, 1998] und lockt selektiv die TH1-Lymphozyten an die Stelle der Infektion. Während Khaiboullina et al. [2005] eine RANTES-Genexpression nur nach der Infektion von Wildtyp-YFV nachweisen konnten, konnte in dieser Arbeit eine Erhöhung von RANTES auch in Impfzwischenfällen ohne fatalen Ausgang nachgewiesen werden.

Die Rolle der Zytokine und Chemokine in der YFV-Pathogenese bedürfen der weiteren Untersuchung, sowohl hinsichtlich der Endothelzellaktivierung, welche eng mit der Vaskulopathie verknüpft ist, als auch hinsichtlich der Endothelzellzerstörung während der YFV-Infektion. Vaskulärer Ausfluss, Leberabnormalitäten und Hämorrhagien sind die lebensbedrohlichen Komplikationen, die sowohl in YFV_{Inf} als auch in YEL-AVD_{Fat} auftreten.

Durch die Untersuchung der Zytokinprofile konnte gezeigt werden, dass die Zytokinausschüttungen am stärksten bei YFV_{Inf} sind. Auch bei dem YEL-AVD_{Fat} sind die Werte im Vergleich zu den Werten von YEL-AVDs und den Impfungen deutlich erhöht. Nicht nur die Stärke der Zytokinausschüttung, sondern auch die Anzahl der Zytokine, die bei YFV_{Inf} und bei YEL-AVD_{Fat} ausgeschüttet werden, ist sehr viel höher.

Bei geringeren Nebenwirkungen nach Impfung wurden deutlich weniger Zytokine in geringerer Konzentration ausgeschüttet. Bei Impfungen ohne erkennbare Nebenwirkungen konnten zwar einige wenige Zytokine gemessen werden, jedoch konnte daraus kein typisches Zytokinmuster für YFV-Infektionen hergeleitet werden. Die Zytokinreaktionen scheinen bei Impfungen individuell ausgeprägt zu

sein. Weitere Studien zur Untersuchung der selten auftretenden YEL-AE-Fälle sind dringend erforderlich. Kliniker müssen über YEL-AE-Fälle informiert werden, so dass sie YEL-AE-Fälle frühzeitig erkennen, um entsprechende Untersuchungen schon zu Beginn des pathologischen Verlaufes zu ermöglichen.

Der Impfstoff YFV 17D zählt nach wie vor zu einem der sichersten Impfstoffe, dennoch müssen neurotrope und viszerotrope YEL-AE für die Sicherheit der Impflinge weiter untersucht werden. In jüngster Vergangenheit, zwischen 1996 und 2004 gab es 28 eindeutige Fälle von YEL-AVDs: davon 17 Erstimpflinge mit fatalem Ausgang. Die Mehrheit der Patienten war über 50 Jahre alt. Auch Kinder unter 5 Jahren scheinen häufiger betroffen zu sein. Auf Grund fehlender Informationen über die Impflinge ist eine genaue Risikoabschätzung sehr schwierig. Schätzungen des kumulativen Risikos, die die Anzahl der vergebenen Impfdosen berücksichtigen, liegen bei ca. 2 bis 5 schweren Impfwischenfällen pro einer Million verabreichter Impfdosen [Barwick et al., 2004]. Das altersabhängige Risiko für Personen über 60 Jahre wird mit 21 bis 45 YEL-AE pro Million vergebener Impfdosen eingeschätzt. Die Häufigkeit der YEL-AVD erscheint mit zunehmendem Alter (über 60 Jahre alt), sowie bei sehr jungen Kindern (unter 5 Jahren) deutlich erhöht. Auch interne Daten von Sanofi Pasteur deuten auf ein altersabhängiges erhöhtes Risiko für YEL-AVD (persönliche Mitteilung von Dirk Teuwen; Sanofi Pasteur, Lyon). Dabei wurden zwar nur die abgegebenen Impfdosen von Sanofi Pasteur berücksichtigt, doch die beschriebenen Impfwischenfälle kamen bei allen weltweit verwendeten kommerziell erhältlichen YFV-Lebendimpfstoffen vor [Barwick et al., 2004].

Da gerade diese beiden Personengruppen (Kinder unter 5 Jahren, Personen über 60) eine noch nicht so gut ausgebildete bzw. eine nachlassende Immunität aufweisen, könnte dies ein Grund für die teilweise schwere Impfreaktion sein [Kohler et al., 2005]. Dennoch ist eine Kontraindikation für Personen über 60 Jahre nicht zu empfehlen, falls ein Aufenthalt in YFV-Endemiegebieten geplant ist, da hierdurch ein erheblich höheres Erkrankungsrisiko eingegangen wird. Allerdings sollte eine individuelle Impfanamnese andere Risiken bezüglich einer gesteigerten Sensibilität bei Impfungen bzw. Thymusfehlfunktionen abgeklärt werden [Martins et al., 2006]. Für genauere Risikoabschätzung sollte die Datenlage in Zukunft verbessert werden, um besser abschätzen zu können, wie

sich altersabhängige Veränderungen auch in einer veränderten Zytokinausschüttung widerspiegeln.

Eine weitere wichtige Frage ist, inwieweit immunsupprimierte bzw. -defiziente Personen, wie z.B. HIV-Patienten, ein erhöhtes Risiko für YEL-AE haben. Bisher gab es noch keine gemeldeten YEL-AE-Fälle HIV-infizierter Personen. Dies muss in Zukunft weiter untersucht werden, da eine anhaltende Virämie bei HIV-Patienten das Risiko einer Neuroinvasion und Enzephalitis erhöhen könnte, wie auch eine uneingeschränkte Virusproduktion die Leber und andere viszerale Organe schädigen kann [Monath und Cetron, 2002; Cetron et al., 2002]. Erste Untersuchungen zeigen, dass die Serokonversionsrate unter HIV-Infizierten reduziert zu sein scheint. In einer Studie waren bei nur 70 % der HIV-Infizierten (n=33, CD4⁺ T-Lymphozyten >200/mm³) einen Monat nach YF-Impfung neutralisierende Antikörper nachweisbar [Goujon et al., 1995], während die Serokonversionsrate bei gesunden erwachsenen Personen bei über 90 % liegt. In einer zweiten kleineren Studie (n=12) von Tattevin et al. [2004] konnten in allen HIV-Infizierten neutralisierende Antikörper gefunden werden. Bei HIV-infizierten Kindern ist die Rate mit 17 % (n=18) sogar noch kleiner (bei gesunden Kindern: 74 %) [Sibailly et al., 1997; Moss et al., 2003]. Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Untersuchten liegen derzeit nicht vor. Trotz der geringen Datenlage wird HIV-infizierten Personen, die in ein YF-endemisches Gebiet reisen und eine CD4 Zellzahl über 200 Zellen/mm³ haben, eine YFV-Impfung empfohlen [Wilson, 2001; Cetron et al., 2002].

Zukünftige Untersuchungen von Zytokinprofilen von HIV-Patienten könnten einen weiteren Aufschluss über diesen Teilaspekt der zellulären Immunantwort geben.

Obwohl der Impfstoff trotz der Zwischenfälle nach wie vor zu einem der sicheren Lebendimpfstoffen zählt, ist die Überlegung angebracht, inwiefern ein inaktivierter YFV-Impfstoff sinnvoll wäre. Nichtreplizierende Impfstoffe haben den Vorteil, dass keine infektiösen Viren, die eine Wildtyp-ähnliche Infektion hervorrufen können, benötigt werden, sie zudem einfach zu produzieren und relativ stabil sind.

Um einen solchen Impfstoff zu entwickeln, ist das Wissen um die Immunantwort und die langanhaltende Immunität bis heute nicht ausreichend. Die Untersuchungen in dieser Arbeit sollen erste Antworten zu diesen Fragen geben.

Dennoch müssen die Methoden weiter optimiert und standardisiert werden, die für die Evaluierung der humoralen und zellulären Immunantwort notwendig sind. Die Immunantwort ist ein hochkomplexes Zusammenspiel von verschiedensten Interaktionspartnern untereinander. Gerade deswegen ist es notwendig, geeignete Parameter zu finden um die Immunantwort, insbesondere die zelluläre, besser zu charakterisieren. Nur wenn man die Wirkungsweise der alten Impfstoffe versteht, wird es möglich sein, zielgerichtete neue Impfstoffe für Erreger wie HIV und andere Viren zu entwickeln.

IV.4 Mutagenesestudien eines 17D Volllängenklongs

Flavivirusinfektionen bedingen die Bindung des Virus an die Wirtszelle, die durch zelluläre, für YFV noch nicht bekannte Rezeptoren vermittelt wird [Anderson, 2003]. Basierend auf den Strukturuntersuchungen vom E-Protein des TBE Virus (Tick Borne Encephalitis, Flavivirus) [Rey et al., 1995] scheint die Domäne III an der Bindung des zellulären Rezeptors beteiligt zu sein [Bhardwaj et al., 2001; Crill und Roehrig, 2001; Mandl et al., 2000].

In Kooperation von Tuula Geske (Robert Koch-Institut, Berlin) konnte mittels Neutralisations- und passiver Protektionsstudien in vivo bestätigt werden, dass das E-Protein des YFV bei der Interaktion mit der Zelle große Bedeutung hat und für die Infektiosität eine Rolle spielt. Die Antikörper, die hier verwendet wurden (MAK 6538, MAK 6330), sind durch die YFV-Infektion von Mäusen gewonnen worden. In dieser Arbeit wurde für MAK 6538 und MAK 6330 gezeigt, dass sie das E-Protein spezifisch binden und neutralisierende Wirkung besitzen.

Das E-Protein ist somit ein gutes Zielmolekül für die hier angewandten Mutagenesestudien, um die molekularen Determinanten der Attenuierung näher bestimmen zu können.

Die genauen molekularbiologischen Mechanismen der Attenuierung sind nach wie vor nicht geklärt. Mit Hilfe eines infektiösen Volllängenklongs wurden parallel zu den Untersuchungen der Impfwiszenfälle mutierte Volllängenklonge im Bereich des E-Proteins erstellt, um einen Anhaltspunkt zu bekommen, inwieweit die jeweils einzelnen veränderten Aminosäuren (E52, E200 und E299) zu einer Veränderung in der Pathogenität des Virus führen. Dabei wurden die Aminosäuren im E-Protein des Impfstammes YFV 17D jeweils zum Wildtyp YFV-Asibi konvertiert und hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit in Zellkultur untersucht.

Die Hypothese war, dass die mutierten Klone infolge der Konvertierung der drei Aminosäuren in den pathogenen Wildtyp-Asibi-Stamm eine erhöhte Virusreplikation im Vergleich zum YFV 17D in Zellkultur zeigen würden.

Die mutierten Viren, gewonnen aus pMutE52 und pMutE200, zeigen zwar in Vero-Zellen Unterschiede hinsichtlich ihrer Replikation, allerdings nicht in den anderen untersuchten Zelllinien (Tabelle III.16). In Vero-Zellen liegt die Virusreplikation der mutierten Klone teilweise bis zu zehnfach niedriger als die

Rate von 17D. Die Aminosäuren E52 und E200 liegen in der Domäne II [Rey et al., 1995], welche unter den Flaviviren konserviert ist und kreuzreaktive Epitope enthält [Mandl et al., 1989]. Diese Domäne ist durch Disulfidbrücken quervernetzt und vollführt eine Transition bei niedrigem pH-Wert, was dazu führt, dass ein konservierter und hydrophober Arm von Aminosäuren exponiert wird. Dieser steht im Verdacht, für die Fusion der viralen Hülle mit der Endosomenmembran verantwortlich zu sein. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Mutationen und den Vergleich zwischen der Wildtyp- und der korrespondierenden Aminosäure von YFV 17D könnte die Fähigkeit, mit der Endosomenmembran zu fusionieren, beim Wildtyp kleiner sein. Dies ist überraschend, da YFV Asibi als Wildtypstamm pathogener ist. Vermutlich ist der Austausch verschiedener einzelner Aminosäuren notwendig, um die Attenuierung erklären zu können.

Viren, gewonnen aus pMutE299, replizierten in keiner der untersuchten Zelllinien. Das Ausbleiben von Viruspartikeln aus pMut299 könnte einen interessanten Aufschluss über die Aminosäureposition 299 des E-Proteins geben. E-299, (Domäne III des E-Proteins) [Rey et al., 1995] ist wahrscheinlich für die Virusadsorption an einen zellulären Rezeptor verantwortlich und spielt konsequenterweise eine große Rolle für das Wirtsspektrum, den Zelltropismus und vermutlich für die Virulenz bzw. Attenuierung. Mehrere Gründe könnten eine Rolle spielen, dass aus dem pMut299-Plasmid keine Viren isoliert werden konnten. Zum einen könnte die Aminosäure E-299 eine Schlüsselposition im Virusaufbau spielen. Da der YFV Asibi Stamm an Position E299 genau die veränderte Aminosäure trägt, kann nur das Zusammenspiel der veränderten Aminosäure mit einer weiteren Aminosäure im YFV-Genom oder mit einem Aminosäurebereich zu diesem Ergebnis führen.

Zum anderen könnte es sein, dass aus dem Vollängenklon pMutE299 keine infektiöse RNA gebildet wurde. Wenn dies zutrifft, dann würde es bedeuten, dass das Plasmid pMutE299 an einer anderen Stelle als im veränderten E-Genabschnitt einen Defekt hat. Der veränderte E-Genabschnitt selber ist auf seine Sequenz und Orientierung überprüft worden. Dort fanden sich keine Defekte. Nur eine vollständige Sequenzierung des Vollängenklons hinsichtlich anderweitiger Sequenzfehler könnte zur weiteren Aufklärung beitragen. Eine weitere Möglichkeit wäre der schnelle Abbau der RNA in der Zelle, bevor die Translation der Virusproteine beginnen kann. Dies sollte in einer Studie der

Kinetik der Virusreplikation oder des Virusabbaus nach Transfektion ermittelbar sein.

Die Etablierung eines infektiösen Klons leistet einen wesentlichen Beitrag für die Untersuchung der funktionellen Eigenschaften des Virusgenoms. Das Gen für das E-Protein spielt hierbei eine besondere Rolle bezüglich der Attenuierung, wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Hier finden sich die variablen Regionen wieder, die sowohl im Zusammenhang mit der Pathogenität des YFV als auch mit der Immunantwort des Wirtes eine Schlüsselrolle spielen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass einzelne Aminosäure-Austausche im E-Protein (E52, E200 und E299) zwar Veränderungen in der Virusreplikation zeigen, diese allein jedoch noch nicht die Attenuierung erklären können. Die veränderten Aminosäuren zeigten trotz ihrer Rückmutation in den Wildtyp keine Steigerung der Replikationseffizienz, aber eine Abschwächung bzw. sogar das gänzliche Ausbleiben der viralen Produktion.

Obwohl bekannt ist, dass eine sehr kleine Anzahl von Aminosäureaustausche mit phänotypischen Veränderungen assoziiert werden kann [Jennings et al., 1994; Barrett et al., 1990b; Dunster et al., 1990; Monath et al., 2002; Hanley et al., 2003], sind generelle Vorhersagen bezüglich der phänotypischen Auswirkungen der Sequenz-Divergenz schwierig abzuleiten. Beispielsweise müssten auch die Variationen der Wildtypstämme (10-25 % Nukleotid-Divergenz) mit 3-5 % Aminosäure-Divergenz (in den hier untersuchten Wildtypinfektionen: 3,4 bis 3,6 %) klar mit den verschiedenen Phänotypen *in vitro*- oder *in vivo*-Modellen assoziiert werden.

In weiteren Mutationsstudien soll der molekulare Zusammenhang des Gens für das E-Protein mit der Pathogenität des YFV weiter aufgeklärt werden. Dabei sollen in Zukunft weitere einzelne Aminosäureaustausche im E-Protein, sowie mehrere Austausche bis hin zum ganzen E-Proteinaustausch durchgeführt werden. Nach einem wie hier durchgeführten Zellkultur-Vorscreening wäre dann eine anschließende Untersuchung der entwickelten Mutanten im Affenmodell hinsichtlich einer veränderten Immunantwort *in vivo* sinnvoll.