

**„Untersuchungen zur Immunantwort nach
Gelbfieberimpfung sowie Etablierung einer
antiviralen Strategie mittels siRNA“**

Dissertation

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



eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Matthias Benjamin Böthe

aus Berlin

2011

Die vorliegende Arbeit wurde vom Juni 2006 bis September 2010 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Matthias Niedrig am Robert Koch-Institut Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Niedrig, Robert Koch-Institut Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Disputation am: 07. März 2011

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ort, Datum

Matthias Böthe

Den wichtigsten Menschen in meinem Leben.

Danksagung

Besonderer Dank geht an Sie, **Herr Prof. Matthias Niedrig** dafür, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, unter Ihrer Anleitung an einem sehr spannenden Thema zu forschen und letztendlich die ersehnten zwei Buchstaben zu erhalten.

Herr Prof. Rupert Mutzel, Ihnen möchte ich herzlich dafür danken, dass Sie einer der wenigen Professoren der FU sind, die auch externe Promovenden gerne betreuen und sich dadurch viel Arbeit auferlegen.

Besonderer Dank gebührt **Nicole**, denn nur durch die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Impfstudie konnte ich eine so umfassende Arbeit einreichen. Ebenso möchte ich **Sigi** für die vielen Ratschläge und Hinweise danken die, ich in der ganzen Zeit erhalten habe.

Nina, Dir möchte ich für die vielen kritischen Fragen, die Diskussionen über meine Arbeit (außer über Zytokine ;)) und natürlich ganz besonders für die umfangreiche und zeitaufwendige Erstkorrektur danken.

Nadine möchte ich für die jahrelange, ergiebige Benachbarschaft, die vielen Stunden der Diskussion und die sehr fröhliche Zusammenarbeit beim Aufbau des RoKoDoKo danken. Letzteres kam bei meinen Bewerbungsgesprächen sehr gut an und hat mir vielleicht auch ein bisschen zu meiner neuen Stelle verholfen.

Bei Dir **Katha** möchte ich mich ebenso für die vielen Tipps und Anregungen bedanken die in diese Arbeit eingeflossen sind. Besonderer Dank gilt Dir für die vielen Skype-Chats in denen wir über Bewerbungen, Anschreiben, Lebensläufe und Gehälter diskutiert haben. Ich hoffe bei Dir lohnt sich das genauso wie bei mir!

Sonja möchte ich dafür danken, dass ich mir gefühlte drei Millionen Mal Bücher von Ihr entführen durfte und dass Sie immer ein offenes Ohr für meine Probleme mit dieser Arbeit nebst einem guten Tipp hatte.

Dir **Annette** möchte ich für Deine Hilfsbereitschaft, Deine Unterstützung bei den Versuchen und für Deinen Überblick über die Freezer danken.

Auch bei meinen „kleinen“ Nachwuchswissenschaftlern **Erik, Henrike** und **Jin** möchte ich mich für die Mitarbeit an dieser Arbeit bedanken.

Besonders zu Beginn meiner Promotion waren die „Ehemaligen“ **Hi-Gung, René** und **Marcel** mit guten Ratschlägen sehr wichtig für das Gelingen der Arbeit.

Die gesamte **Arbeitsgruppe** hat für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, für viele Kuchen und eine insgesamt schöne Zeit gesorgt, die sich sehr positiv auf diese Arbeit ausgewirkt hat.

Ohne **Anja** und **Ati** würde der Text wahrscheinlich noch mit Massen von kleinen Fehlern übersät sein. Vielen Dank, dass dem Leser dies erspart bleibt.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen **Eltern** bedanken, die immer hinter mir stehen und mich in allem was ich tue voll unterstützen.

Dir **Jürgen** möchte ich für die vielfältige Unterstützung danken, die mir das Leben deutlich erleichtert hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen meinen **Freunden** (natürlich auch die in der AG) dafür bedanken, dass Ihr mein Leben rund um die Arbeit in den letzten Jahren mit viel Ablenkung, Unternehmungen und Spaß bereichert habt! Ohne Euch wäre das Alles nichts wert.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	5
2.1	Das <i>Gelbfiebervirus</i>	5
2.1.1	Geschichte, Übertragung und Verbreitung	5
2.1.2	Aufbau und Molekularbiologie	9
2.1.3	Nachweisverfahren	13
2.1.4	Krankheitsverlauf	14
2.1.5	Gelbfieberimpfung und Impfwisfenfälle	16
2.1.6	Immunreaktion auf das <i>GFV</i>	18
2.2	RNA-Interferenz	23
2.2.1	Funktionsweise der RNA-Interferenz	24
2.2.2	Therapeutische Potential von RNAi	26
3	Zielsetzung	27
4	Material und Methoden	29
4.1	Material	29
4.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
4.1.1.1	Geräte	29
4.1.1.2	Verbrauchsmaterialien	31
4.1.2	Chemikalien	33
4.1.3	Enzyme und Inhibitoren	34
4.1.4	Puffer und Lösungen	35
4.1.5	Medien	36
4.1.5.1	Zellkulturmedien	36
4.1.5.2	Andere Medien	36
4.1.6	Oligonukleotide und Nukleinsäurestandards	37
4.1.6.1	Primer, Oligonukleotide und Sonden	37
4.1.6.2	Nukleinsäurestandards	38
4.1.7	Plasmide	38
4.1.8	Antikörper	38
4.1.9	Verwendete Kits	39
4.1.10	Zelllinien, Bakterien- und Virusstämme	39
4.1.10.1	Zelllinien	39
4.1.10.2	Bakterienstämme	40
4.1.10.3	Virusstämme	40
4.1.11	Software	40

4.2	Methoden.....	42
4.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	42
4.2.1.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> -Bakterien.....	42
4.2.1.2	Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen	42
4.2.1.3	Kleine Plasmidpräparation – Miniprep	42
4.2.1.4	Große Plasmidpräparation – Maxiprep (endotoxinfrei).....	42
4.2.1.5	Herstellung calciumchlorid-kompetenter Bakterien	42
4.2.1.6	Hitzeschocktransformation calciumchlorid-kompetenter Bakterien	43
4.2.1.7	Messung der optischen Dichte einer Bakteriensuspension bei 600 nm	43
4.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	44
4.2.2.1	Virus-RNA-Isolierung aus zellfreien Lösungen.....	44
4.2.2.2	RNA-Isolierung aus Zellen.....	44
4.2.2.3	UV-Absorptionsmessung von Nukleinsäuren.....	44
4.2.2.4	Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	45
4.2.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	45
4.2.2.6	Reverse Transkription	45
4.2.2.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR)-basierte Techniken.....	47
4.2.2.8	Herstellung von siRNA-Plasmiden.....	50
4.2.3	Virologische Methoden.....	52
4.2.3.1	Virustitration mittels Plaque-Test	52
4.2.3.2	Herstellung hochtitriger Viruslösungen	53
4.2.3.3	Fluoreszenznachweis infizierter Zellen	54
4.2.3.4	Infektion von Zellen	54
4.2.3.5	Virusisolierung aus Zellen	55
4.2.4	Serologische Techniken.....	55
4.2.4.1	Indirekte Immunfluoreszenztests (IIFT).....	55
4.2.4.2	Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT).....	56
4.2.5	Immunologische Techniken.....	57
4.2.5.1	Zytokinbestimmung in Seren	57
4.2.5.2	Analyse der zellulären Immunreaktion.....	59
4.2.6	Zellkultur	62
4.2.6.1	Kultivierung adhärenter Zellen.....	62
4.2.6.2	Zellzahlbestimmung.....	62
4.2.6.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	63
4.2.6.4	Transfektion von Zellen	63
4.2.7	Gelbfieber-Impfstudie.....	65
4.2.7.1	Studienziel.....	65

4.2.7.2	Aufbau der Studie.....	65
4.2.7.3	Probandenauswahl.....	66
4.2.7.4	Impfungen	66
4.2.7.5	Probengewinnung, -verarbeitung und -lagerung.....	66
4.2.8	Statistische Analyse	67
5	Ergebnisse	69
5.1	Analyse von <i>GFV</i> -assoziierten Impfwischenfällen	69
5.1.1	Hintergrund der Impfkampagne.....	69
5.1.2	Impfkampagne in Togo 2007.....	69
5.1.3	Impfkampagne in Mali 2008	72
5.1.4	Impfkampagne in Sierra Leone 2009.....	75
5.2	Ergebnisse der Impfstudie	76
5.2.1	Darstellung des Probandenkollektivs.....	76
5.2.2	Verlauf der Virämie	77
5.2.2.1	Nachweis viraler Genomäquivalente im Serum	77
5.2.2.2	Nachweis infektiöser Viruspartikel im Serum	78
5.2.3	Verlauf der humoralen Immunantwort	78
5.2.3.1	Nachweis <i>GFV</i> -spezifischer Antikörper.....	78
5.2.3.2	Bestimmung der neutralisierenden Antikörper gegen das <i>GFV</i>	82
5.2.3.3	Bestimmung der neutralisierenden Antikörper gegen das <i>FSME-Virus</i>	84
5.2.3.4	Untersuchung der Zytokinexpression im Serum der Probanden	85
5.2.4	Vergleich der Daten mit der zellulären Immunreaktion	92
5.2.4.1	Untersuchung zellulärer Parameter in Abhängigkeit der Virämie.....	92
5.2.4.2	Untersuchung zellulärer Parameter in Abhängigkeit der Höhe des Neutralisationstiters an Tag 14	95
5.2.4.3	Untersuchung der <i>GFV</i> -spezifischen CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ T-Zellen sowie der Plasmablasten.....	97
5.2.5	Betrachtung zweier Probanden (#20 und #12) mit abweichender Zytokinexpression	99
5.3	Analyse afrikanischer Wildtypinfektionen	106
5.4	Entwicklung einer antiviralen Strategie mittels siRNA-basierter Replikationshemmung.....	109
5.4.1	Auswahl der gegen das <i>GFV</i> gerichteten siRNA-Sequenzen	109
5.4.2	Herstellung der Expressionsplasmide	110
5.4.3	Bestimmung der initialen Infektionsdosis.....	110
5.4.4	Optimierung der Transfektionseffizienz	111
5.4.5	Wirksamkeitsuntersuchung der siRNAs	112
5.4.5.1	Inhibition der Replikation des 17D-Gelbfieberimpfstammes durch die siRNAs	113

5.4.5.2	Wirkung der siRNAs auf den <i>GFV</i> Asibi-Wildtypstamm	116
6	Diskussion.....	119
6.1	Analyse von schweren GF-Impfzwischenfällen	119
6.2	Die Immunreaktion nach einer GF-Impfung.....	124
6.2.1	Verlauf der Virämie	124
6.2.2	Die humoralen Immunantwort	128
6.2.3	Zytokinausschüttung nach GF-Impfung.....	131
6.2.4	Betrachtung einzelner Probanden der Studie	139
6.3	Hemmung der viralen Replikation durch RNA- Interferenz	140
7	Zusammenfassung.....	145
8	Summary.....	147
9	Veröffentlichungen	148
10	Literaturverzeichnis	149

1 Abkürzungsverzeichnis

17D(-204)	<i>Gelbfiebertvirus</i> 17D-204 Impfstamm	DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan – Insektizid
17DD	<i>Gelbfiebertvirus</i> 17DD-Impfstamm	<i>DENV</i>	<i>Dengue-Virus</i>
A	Adenin	div.	diverse
α	anti	DMSO	Dimethylsulfoxid
A ₂₆₀	spektroskopischer Absorptionswert bei 260 nm	DNA	Desoxyribonukleinsäure
A ₂₈₀	spektroskopischer Absorptionswert bei 280 nm	DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungs- zentrum Berlin
Abb.	Abbildung	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ad	bis zu	dsRNA	doppelsträngige RNA
ADE	„antibody dependant enhancement“ – antikörpervermittelte Virusaufnahme in Immunzellen	DTT	Dithiothreitol
Ae.	<i>Aedes</i>	(m/p) DZ	(myeloide/plasmazytoide) dendritische Zellen
AEFI	„adverse event following immunisation“ – Impfzwischenfall	<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
AK	Antikörper	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ATCC	„American Type Culture Collection“	ELISA	„Enzyme Linked Immunsorbent Assay“ – enzymgekoppelter Immunsorptionstest
bp	Basenpaare	ER	Endoplasmatisches Retikulum
BSA	bovines Serumalbumin	<i>et al.</i>	„ <i>et alteri</i> “ – und andere
C	Cytosin	Fa.	Firma
c	Konzentration	FACS	„fluorescence activated cell sorting“ – Durchflusszytometrie
C _T	Schwellenwertzyklus	FAM	6-Carboxy-Fluorescein
CaCl ₂	Calciumchlorid	FE	Fluoreszenzeinheiten
Cap	<i>Flavivirus</i> 5'-Capstruktur (m ⁷ G(5')ppp(5')Am ²)	FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
CD	„cluster of differentiation“ – Oberflächenmarker	FKS	fötales Kälberserum
cDNA	komplementäre DNA	<i>FNV</i>	„ <i>french neurotropic vaccine</i> “ – <i>GFV</i> -Impfstamm
CMC	Carboxymethylcellulose	FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	<i>FSMEV</i>	<i>Frühsommer- Meningoenzephalitisvirus</i>
CPE	Zytopathischer Effekt	G	Guanin
CSF	„cerebrospinal fluid“ - Liquor cerebrospinalis	GÄ	Genomäquivalente
dest.	destilliert	GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
D-MEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium	<i>GFV</i>	<i>Gelbfiebertvirus / -viren</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	<i>HBV</i>	<i>Hepatitis-B-Virus</i>
		<i>HCV</i>	<i>Hepatitis-C-Virus</i>
		<i>HIV</i>	<i>Humanes Immundefizienz-Virus</i>
		H ₂ O	Wasser
		HRP	Meerrettichperoxidase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IAS	Institut für Arbeits- und Sozialhygiene Stiftung	p-Wert	Signifikanzwert
IgG/IgM	Immunglobuline Klasse G/M	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
IIFT	indirekter Immunfluoreszenztest	PCR	„polymerase chain reaction“ – Polymerase Kettenreaktion
IF	Immunfluoreszenzfärbung	PFU	„plaque forming units“ – infektiöse Partikel
I.U.	Internationale Einheiten	pH	„ponds Hydrogenii“ – negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
<i>JEV</i>	<i>Japanische Enzephalitisvirus</i>	pre-miRNA	2. Vorstufe der miRNA
KAc	Kaliumacetat	pri-miRNA	1. Vorstufe der miRNA
kb	kilo Basen	PRNT	Plaque-Reduktions-Neutralisationstest
kbp	kilo Basenpaare	PRR	„pattern recognition receptors“ – Strukturerkennungsrezeptoren
KCl	Kaliumchlorid	PS	Polystyrol
kDa	kilo Dalton	RbCl	Rubidiumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	RISC	„RNA-induced silencing complex“ – RNAi vermittelnder Protein-komplex
KOH	Kaliumhydroxid	RLC	„RISC loading complex“ – Proteinkomplex, der RISC belädt
lat.	lateinisch	RNA	Ribonukleinsäure
LB	Luria-Bertani	RNAi	RNA-Interferenz
Lsg.	Lösung	RNase	Ribonuklease
m	männlich	rpm	„rotations per minute“ – Umdrehungen pro Minute
MAK	monoklonaler Antikörper	ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	RKI	Robert Koch-Institut
MHC I/II	„major histocompatibility complex“ – Rezeptoren der Immun-erkennung	RT	reverse Transkription/-kriptase
Mio.	Millionen	RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
M-MLV RT	„Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase“	SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
MMP	Matrix-Metalloprotease	shRNA	„short hairpin RNA“ – RNA mit Haarnadelstruktur
MnCl ₂	Manganchlorid	siRNA	„small interfering RNA“ – kleine RNA-Oligonukleotide, die RNA-Interferenz auslösen
MOI	„multiplicity of infection“ – Infektionsdosis	ssp.	Subspezies
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	T	Temperatur/Thymin
mRNA	Boten-RNA	Tab.	Tabelle
miRNA	microRNA	TAMRA	5-Carboxytetramethylrhodamin
NaCl	Natriumchlorid	<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat	T _{H1} /T _{H2}	gegen intrazelluläre/extrazelluläre Pathogene ausgerichtete Immun-Antwort
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat		
NaOH	Natriumhydroxid		
NKZ/NK-Zellen	natürliche Killerzellen		
Nr.	Nummer		
NS	virales Nicht-Strukturprotein		
NTP	Nukleosidtriphosphate		
NTR	nicht-translatierter Bereich		
OT	Objektträger		
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm		

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TLR	„Toll-like“ Rezeptoren	WNV	<i>West-Nil-Virus</i>
t _{ni}	Tage nach Infektion	w/w	Masse pro Masse –
U	Uracil		Massenprozent
üN	über Nacht	w/v	Masse pro Volumen
ÜS	Überstand	YEL-AND	„yellow fever vaccine-associated neurotropic disease“ –
UV	ultraviolett		neurotroper Impfwischenfall
vRNA	virale RNA		neurotroper Impfwischenfall
v/v	Volumen pro Volumen – Volumenprozent	YEL-AVD	“yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease“ –
Verd.	Verdünnung		viscerotroper Impfwischenfall
Vol	Volumen	YFV	“ <i>yellow fever virus</i> ” –
w	weiblich		<i>Gelbfiebertvirus</i>
WHO	„world health organisation“ – Weltgesundheitsorganisation	Zentrif.	Zentrifugation
		ZK	Zellkontrolle

Einheiten:

%	Prozent	µM	Mikromolar (mikromol / Liter)
°C	Grad Celsius	M	Molar (mol / Liter)
C _T	Schwellenwert Zyklus	m	(Molekül)masse
g	Gramm	mg	Milligramm
	als „x g“ Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)	min	Minute(n)
		mL	Milliliter
h	Stunde(n)	nm	Nanometer
kDa	kilo Dalton	ng	Nanogramm
L	Liter	s	Sekunde(n)
µg	Mikrogramm	U	Unit(s)
µL	Mikroliter	V	Volt

2 Einleitung

2.1 Das Gelbfiebervirus

2.1.1 Geschichte, Übertragung und Verbreitung

Das *Gelbfiebervirus* (GFV) ist das Referenzvirus der *Flaviviren*, von dem sich auch der Name Gelb lat. flavus ableitet. Neben den *Flaviviren* gehören die Gattungen *Pestivirus* und *Hepacivirus* zu der Familie der *Flaviviridae*. Die meisten der 53 bekannten *Flaviviren* werden durch Mücken oder Zecken übertragen und daher zu den Arboviren („arthropod-borne“ – durch Arthropoden übertragen) gezählt [1]. Zu den humanpathogenen *Flaviviren* gehören z.B. das *Dengue*-, *West-Nil*-, *Frühsommer-Meningoenzephalitis*- und *Japanische Enzephalitisvirus*.

Das GFV ist wahrscheinlich vor etwa 3.000 Jahren [2] in Zentralafrika [3] aus einem Vorgänger entstanden und hat sich dann mit seinen Vektoren den Handelswegen folgend über Ost- und Westafrika bis nach Europa sowie nach Süd- und Nordamerika ausgebreitet. Besonders vom 17. bis zum 19. Jahrhundert kam es häufig zu großen Gelbfieber-Epidemien mit zahllosen Opfern [4]. Erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden Mücken als Überträger des Gelbfiebers (GF) identifiziert und der Infektionszyklus analysiert [5]. Der Zyklus beginnt mit der Infektion der weiblichen Mücken durch eine Blutmahlzeit an einem virämischen Patienten oder einem Affen. Zunächst vermehrt sich das Virus in den Epithelzellen im Verdauungstrakt und breitet sich daraufhin bis in die Speicheldrüsen aus, was dazu führt, dass die Mücke das Virus bei der nächsten Blutmahlzeit auf den neuen Wirt übertragen kann. Die Dauer zwischen Aufnahme des Virus und der Ausscheidung über die Speicheldrüsen wird als extrinsische Inkubationszeit bezeichnet. In Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur liegt sie bei 4 bis 18 Tagen. Zusätzlich können auch die Eier einer infizierten Mücke das Virus in sich tragen, sodass die nächste Mückengeneration bereits infiziert ist. Diese transovarielle Übertragung findet jedoch nur zu einem sehr geringen Prozentsatz statt [6, 7].

Mit dem Wissen über die Verbreitung des Virus konnten speziell in Südamerika Maßnahmen ergriffen werden, die eine weitere Verbreitung der Vektoren eindämmten [8-10]. Zunächst wurden hauptsächlich Brutstätten trockengelegt, später kam mit dem großflächigen Einsatz von Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) eine effektive Maßnahme gegen adulte Mücken hinzu [11].

Heute ist bekannt, dass es drei verschiedene Übertragungszyklen auf den Menschen gibt, wie in der folgenden Abbildung 2.1 dargestellt. Im Dschungelzyklus übertragen *Haemagogus* ssp. in Südamerika bzw. *Aedes africanus* in Afrika das Virus zwischen Primaten. In Südafrika sind hauptsächlich Brüllaffen (*Alloutta* ssp.) davon betroffen, die im Gegensatz zu den in Afrika beteiligten Primaten (*Colobus abyssinicus*, *Cercopithecus* ssp. und *Galago senegalensis*) eine symptomatische Erkrankung durchmachen und häufig daran sterben [4]. Die ständige Zirkulation des Virus zwischen den Primaten bildet ein Reservoir für das Virus, welches eine vollständige Ausrottung unmöglich macht. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt jedoch nur sporadisch, da die Mücken den Menschen nicht als Wirt betrachten und ihn nur sehr selten infizieren. In den afrikanischen Feuchtsavannen hat sich der sogenannte intermediäre oder Savannenzzyklus ausgebildet. Das GFV wird dabei von *Aedes*-Mücken ebenfalls zwischen Primaten übertragen. Die beteiligten Vektoren unterscheiden sich jedoch von denen im Dschungelzyklus in der Art, dass sie auch den Menschen als Wirt nutzen. Es kommt daher viel häufiger zu Übertragungen auf den Menschen. Der gefährlichste Übertragungsweg ist der urbane Zyklus (siehe Abbildung 2.1), bei dem es unabhängig von tierischen Wirten zu einer kontinuierlichen Übertragung des Virus zwischen Menschen durch *Aedes aegypti* kommt. Diese Mückenart ist hervorragend an ein Leben in der unmittelbaren Umgebung des Menschen angepasst, indem ihr z.B. bereits kurzzeitige Wasseransammlungen in Blumentöpfen oder weggeworfenen Dosen genügen, um sich zu vermehren [12].

Im Jahre 1927 wurde das Virus zeitgleich von amerikanischen (Asibi-Stamm) und französischen Forschern („french viscerotropic virus“) isoliert und 1936 wurde von Theiler *et al.* ein attenuiertes Virus als Impfstoff gegen die Wildtypinfektion entwickelt [13, 14]. Der Impfstoff (siehe auch 2.1.5) wird seitdem zur Eindämmung von Epidemien sowie zur Grundimmunisierung der Bevölkerung eingesetzt.

Bis etwa 1970 wurde das GFV durch die Kontrolle der Mücken und den Einsatz des Impfstoffes in Südamerika fast völlig ausgerottet und in Afrika weit zurückgedrängt. In Nordamerika und Europa war der Erreger zu dieser Zeit kein medizinisches Problem mehr.

Der massive Rückgang der Mückenkontrolle seit dieser Zeit führte jedoch dazu, dass *Ae. aegypti* in Südamerika und dem Süden Nordamerikas sowie in großen Teilen Afrikas wieder anzutreffen ist und mit dem Vektor auch das GFV [15].

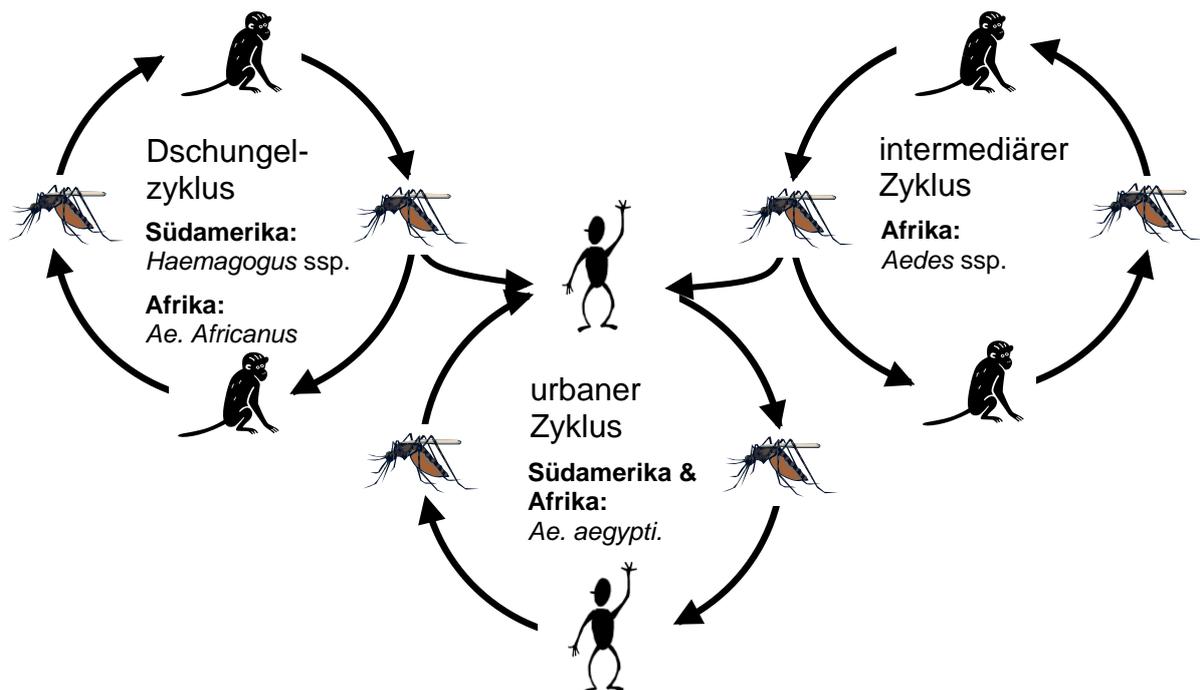


Abbildung 2.1: Übertragungswege des Gelbfiebers [Quelle: Niedrig und Böthe, 2008 [16]].
 Dargestellt sind die drei in Afrika und Südamerika auftretenden Übertragungszyklen des GFV auf den Menschen sowie die dabei hauptsächlich auftretenden Vektoren.

Heute ist das GFV in Südamerika, wie in der folgenden Abbildung 2.2 dargestellt, beginnend etwa südlich des Panamakanals bis an die Nordgrenze Argentiniens bzw. den Süden Brasiliens endemisch. In Afrika beginnt die Ausbreitung südlich der Sahara und erstreckt sich bis an die Südgrenzen Angolas, der Demokratischen Republik Kongo sowie Tansanias (Abbildung 2.2). Insgesamt wurden sieben verschiedene Genotypen identifiziert, die sich jeweils durch einen Sequenzunterschied von mehr als 9 % definieren. Fünf dieser GFV-Genotypen wurden in Afrika (Genotypen: Westafrika I und II, Angola, Ost und Zentralafrika sowie Ostafrika) und zwei in Südamerika (Südamerika I und II) gefunden.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht jährlich von 200.000 Gelbfiebers-Infektionen und 30.000 Todesopfern aus [17], wobei die Dunkelziffer 10- bis 500-fach höher geschätzt wird [18, 19] und seit Jahren immer weiter steigt. In Afrika, wo etwa 90 % der gemeldeten Fälle auftreten [20], leben schätzungsweise 610 Millionen Menschen in Gelbfiebersrisikogebieten, davon 219 Millionen unter urbanen Bedingungen [21]. Eine besondere Gefahr stellt die mögliche Etablierung eines urbanen Zyklus in den Millionenstädten dar. Auf Grund der schlechten Versorgungslage und der ständigen Migrationsbewegungen wäre das GFV dort nicht mehr einzudämmen und würde zu ständigen Epidemien führen. Die Ausbrüche würden, verglichen mit den heute auftretenden relativ begrenzten Ausbrüchen in entlegeneren Gebieten, ein Vielfaches an Menschen

betreffen. Das Ausmaß dieses Risikos zeigt sich bei der Betrachtung des *Dengue-Virus* (*DENV*), dass diese Urbanisierung bereits erfolgreich vollzogen hat. Durch die weltweite Verbreitung, die perfekte Anpassung an *Ae. aegypti* sowie die Etablierung von urbanen Zyklen verursacht das *DENV* jährlich geschätzte 50 bis 100 Millionen Neuinfektionen weltweit, darunter 25.000 Todesfälle [22, 23]. Das *DENV* führt somit zu deutlich mehr Neuinfektionen pro Jahr als beispielsweise die saisonale Influenza mit 3-5 Millionen [24] oder als das *Humane Immundefizienz-Virus* (*HIV*) mit 2,7 Millionen (im Jahr 2008) Infektionen [25].

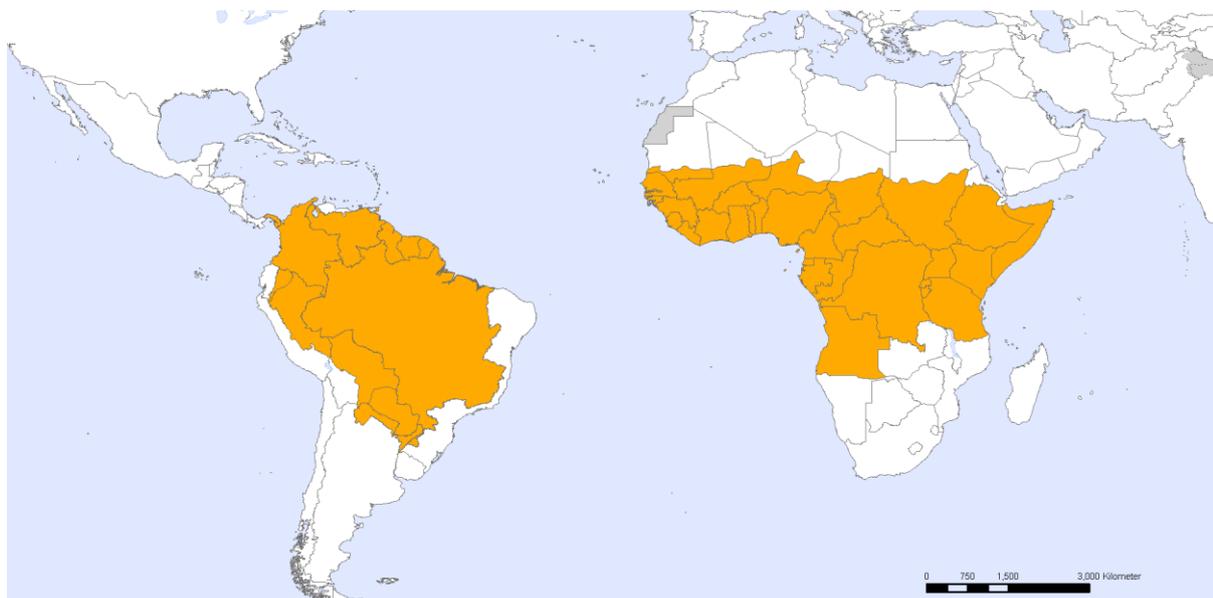


Abbildung 2.2: Ausbreitung des Gelbfiebers in Südamerika und Afrika [Quelle: verändert nach WHO, 2008 [26]].

Dargestellt sind die als Endemiegebiete für das *GFV* angesehenen Regionen in Südamerika und Afrika (Stand 2008).

Diese Entwicklungen führten in den letzten Jahrzehnten zu einer zunehmenden Sensibilisierung für das *GFV*. Betroffene Länder beginnen wieder mit der Vektorkontrolle und großangelegten Massenimpfungen in Verbindung mit einer frühzeitigen Impfung von Kindern. Die WHO hat 2007 eine Initiative mit dem Ziel gestartet, in einem Zeitraum von 10 Jahren etwa 48 Millionen Menschen in afrikanischen Hochrisikogebieten zu impfen, um zumindest das Auftreten von urbanem Gelbfieber zu verhindern (siehe auch Kapitel 5.1 auf Seite 69) [27].

Derzeit betrifft die Gelbfieberproblematik Europa nur im Zusammenhang mit Fernreisen, bei denen durch die zur Verfügung stehende Impfung ein Risiko ausgeschlossen werden kann. Durch die Klimaerwärmung haben sich jedoch bereits die ersten *Aedes*-Mücken in

Südeuropa etabliert [28] und werden immer wieder in andere europäische Länder wie z.B. die Niederlande [29], Frankreich [30] oder Spanien [31] importiert. Hält dieser Trend an, ist es nicht auszuschließen, dass sich mit den Mücken auch tropische Krankheitserreger wie das *GFV* dort etablieren [32].

Bestätigt wird diese Gefahr durch einen *Chikungunya-Virus* Ausbruch 2007 in Nordost-Italien. Vermutet wurde in diesem Fall, dass ein Rückreisender aus Indien zum Zeitpunkt der Ankunft in einem kleinen Dorf hochvirämisch war, da er zwei Tage später Symptome entwickelte. Es kam zur Übertragung des Virus auf die lokale Mückenpopulation (hauptsächlich *Ae. albopictus*), was zu einer kleinen Epidemie führte. Innerhalb von drei Monaten infizierten sich weitere 205 Menschen mit dem *Chikungunya-Virus*, bis umfangreiche Kontrollmaßnahmen, wie der Einsatz von Insektiziden, die Ausbreitung stoppten konnte [33].

2.1.2 Aufbau und Molekularbiologie

Das *GFV* ist ein membranumhülltes RNA-Virus mit einem Durchmesser von etwa 50 nm. In der folgenden Abbildung 2.3 A ist die schematische Darstellung eines *Flavivirus* gezeigt. Das Genom, 10.862 Basen groß, liegt einzelsträngig in Plusstrangorientierung vor. Die $m^7G(5')ppp(5')Am^2$ 5'-Capstruktur [34] und die Sekundärstrukturen in den nicht-translatierten 3'- und 5'-Bereichen sind essentiell für die Replikation und Translation [1].

Umhüllt wird das Genom von einer sphärischen Kapsel des basischen Kapsid-Proteins (C-Proteins). In die Lipiddoppelmembran des Partikels sind zwei virale Oberflächenproteine, das Matrix- und das Envelope-Protein, eingelagert. Das Envelope-Protein (E-Protein) ist ein glykosyliertes, membrangebundenes Protein mit einer Größe von etwa 53 kDa [1], welches sich zu 90 Dimeren pro Viruspartikel assoziiert [35, 36]. Es ist zudem das wichtigste Oberflächenantigen, gegen das im Verlauf der Infektion oder Impfung neutralisierende Antikörper gebildet werden.

Das nicht glykosylierte Matrix-Protein (M-Protein) ist etwa 7-9 kDa groß. Es entsteht durch die Spaltung des Vorläuferproteins PrM (26 kDa [1]) durch die zelluläre Furin-Protease. Das PrM-Protein bindet im unreifen Viruspartikel das E-Protein und dient möglicherweise als Chaperon für dessen korrekte Faltung [37]. Durch die PrM-E-Assoziation wird zudem die Dimerisierung der E-Proteine verhindert. Mit der Spaltung des PrM-Proteins wird diese Bindung zerstört und es bilden sich E-Proteindimere, die für die Fusion des reifen Viruspartikels mit der Endosomenmembran der infizierten Zelle notwendig sind [38]. Die Reihenfolge der Proteine innerhalb des Genoms ist in Abbildung 2.3 B gezeigt.

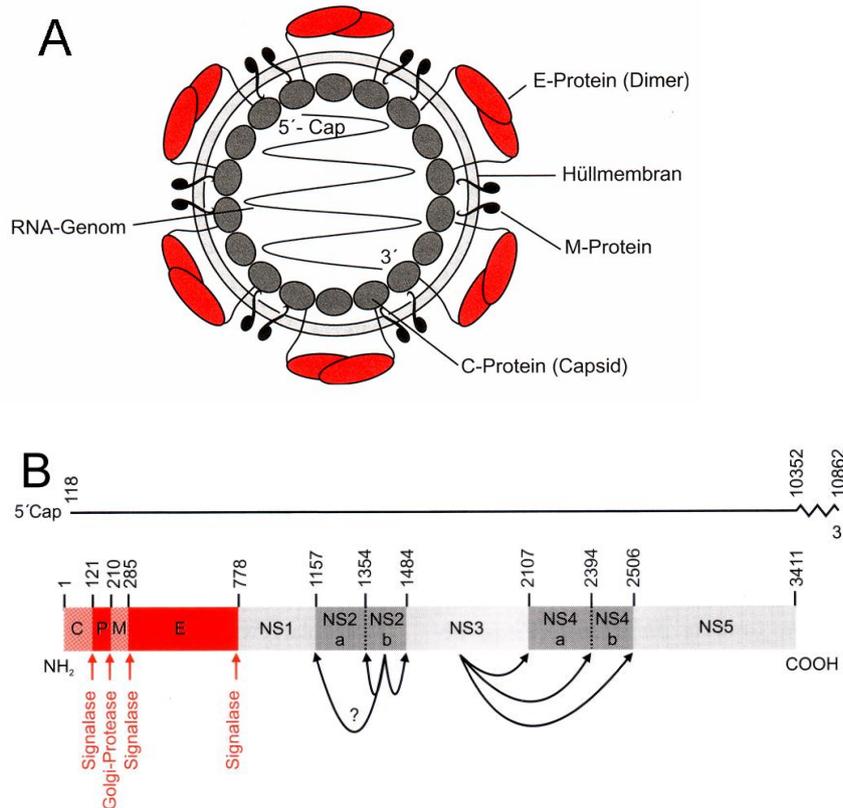


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau (A) sowie Genomstruktur (B) eines Gelbfiebervirus [Quelle: Modrow, 2010 [39]].

A) Dargestellt ist ein Viruspartikel mit dem RNA-Genom, Kapsid und Virushülle. In die Lipiddoppelmembran sind die dimeren E-Proteine sowie die M-Proteine eingelagert. B) Das 5'-Ende des *GFV*-Genoms ist mit einer Cap-Struktur zur Initiierung der Translation versehen. Nach dem 118 Basen umfassenden 5'-nicht-translatierten Bereich schließt sich ein einziger Leserahmen an, der 10.233 Basen bzw. 3.411 Aminosäuren umfasst. Das Polyprotein wird durch die mit Pfeilen angezeigten Proteasen in die drei Strukturproteine (C: Kapsid-Protein, PM: PrM-Vorläuferprotein des Matrix-Proteins, E: Envelope-Protein) sowie die sieben nicht Strukturproteine (NS1-NS5) gespalten. Am 3'-Ende des Genoms schließt sich wiederum eine nicht-translatierte Sequenz von 510 Basen an.

Die *GFV* dringen hauptsächlich über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zielzellen ein, wobei vermutlich eine Reihe von zellulären Rezeptoren für die Wechselwirkung mit dem E-Protein verantwortlich sind.

Nach erfolgter Endozytose werden die Endosomen durch Protonenpumpen angesäuert (siehe Abbildung 2.4), was die Umlagerung der 90 dimeren E-Proteine zu insgesamt 60 trimeren Strukturen zur Folge hat [40-42]. Bei dieser Umstrukturierung werden die zuvor verborgenen Fusionspeptide der E-Proteine freigelegt und dringen in die endosomale Membran ein. Durch weitere Umlagerungen der E-Proteine kommt es letztendlich zu einer Verschmelzung der viralen mit der endosomalen Membranen und zur Freisetzung des Genoms durch den Zerfall des Kapsids in das Zytosol [36]. Das virale Genom bindet über die Cap-Struktur an zelluläre Ribosomen wobei ein einziges Polyprotein von dem 10.233 Basen großen Leserahmen translatiert wird. Das N-terminale Ende des C-Proteins besitzt eine

Signalsequenz, die das Ribosom zur Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) dirigiert wo das PrM- und E-Protein in das Lumen des ER translatiert und in der Membran cotranslational verankert werden. Dabei kommt es auch zur Verbindung beider Strukturproteine, um eine vorzeitige Membran-Fusionsaktivität des E-Proteins während der Sekretion zu unterbinden [43, 44].

Eine zelluläre Signalase spaltet die einzelnen Strukturproteine wie in Abbildung 2.3 B dargestellt. Das C-Protein bleibt weiterhin mit der ER-Membran assoziiert, obwohl es keinen Membrananker besitzt. Einige der Nicht-Strukturproteine besitzen ebenfalls Transmembrandomänen, sodass eine räumliche Nähe der Abläufe zur ER-Membran gegeben ist. Sobald die Serinprotease NS3 sowie deren Cofaktor NS2b gebildet wurden, kommt es zur autokatalytischen cis- und trans-Spaltung aller Nicht-Strukturproteine bis auf die der Spaltstelle NS1/NS2a, deren verantwortliches Enzym nicht bekannt ist. Die Replikation des Genoms erfolgt asymmetrisch durch einen Replikasekomplex, der zumindest zeitweise aus den Proteinen NS1/NS4a/NS5 sowie NS3 als Helikase gebildet wird [45]. NS5 katalysiert als RNA-abhängige RNA-Polymerase zunächst die Synthese von Negativstrang-Matrizen, die bereits drei Stunden nach der Infektion nachweisbar sind [46]. Von diesen Matrizen werden neue Positivstränge erzeugt, die gleichzeitig mit der Cap-Struktur versehen werden. Die Plusstränge werden etwa in einem zehnfachen Überschuss im Vergleich zu den Negativsträngen synthetisiert [47]. NS1 erscheint während einer Infektion neben der Beteiligung an der Replikation sowohl als Dimer auf der Zelloberfläche als auch als Hexamer in einer löslichen Form im Blut. Gegen dieses Protein bildet der Körper protektive Antikörper, die durch Bindung an zellassoziertes NS1 zu einer komplementvermittelten Zerstörung der infizierten Zelle führen können [48]. Die biologische Bedeutung des Auftretens der NS1-Proteine außerhalb der Zelle ist nicht bekannt.

Die Interaktion der RNA-Genome mit den C-Proteinen, die als Dimere an der ER-Membran angelagert sind, bewirken strukturelle Änderungen die zur Entstehung von Nukleokapsidvorläufern an der ER-Membran führen, wie in Abbildung 2.4 gezeigt [49]. Diese Strukturen stülpen sich in das ER-Lumen und werden dabei von der ER-Membran mit PrM/E-Proteinen umschlossen. Es gibt Hinweise darauf, dass an diesem Prozess das NS2a-Protein beteiligt ist, wobei die genaue Funktion nicht bekannt ist [50].

Die unreifen Virionen werden der zellulären Glykosylierung im Golgi-Apparat unterzogen, was den Schluss zulässt, dass die Ausschleusung über einen normalen sekretorischen Weg verläuft. Kurz vor der Freisetzung der Viren kommt es zur Spaltung des PrM-Proteins durch die zelluläre Furin-Protease, was die Dimerbildung der E-Proteine erlaubt und die Entstehung von infektiösen Partikeln abschließt. Diese werden durch die Fusion der

sekretorischen Transportvesikel mit der Plasmamembran aus der Zelle ausgeschleust [51]. Der Replikationsmechanismus ist insgesamt sehr schnell, was dazu führt, dass die maximale Konzentration an Virionen in infizierten Zellen bereits etwa 24 Stunden nach der Infektion erreicht wird [52].

Die Funktion des NS4b-Proteins in diesem Prozess ist weitgehend unbekannt. Es konnte bis jetzt nur gezeigt werden, dass das hydrophobe Protein mit viraler doppelsträngiger RNA sowie NS3 colokalisiert [53, 54].

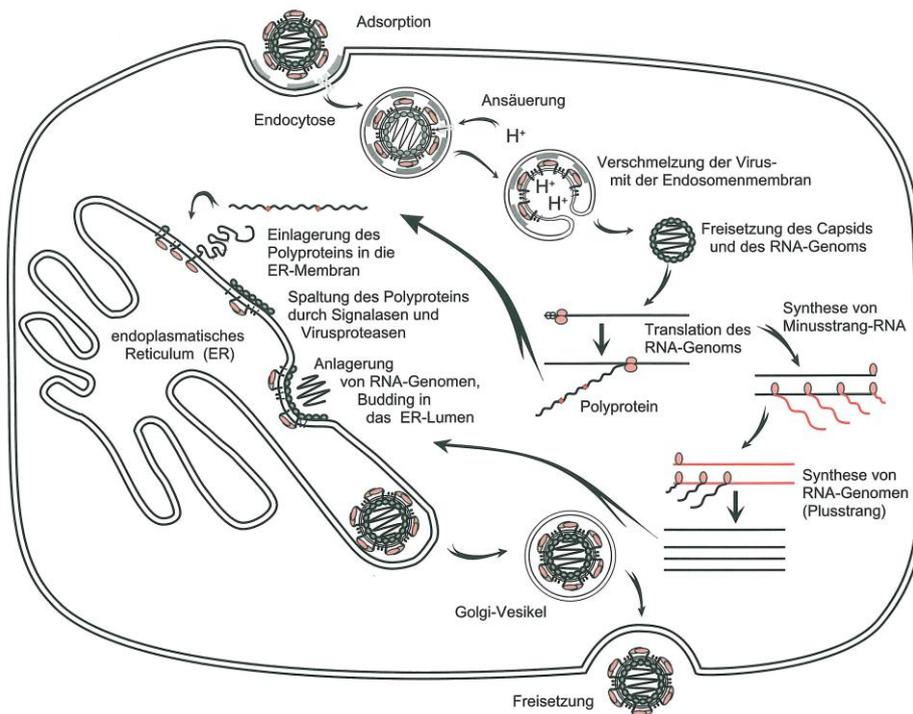


Abbildung 2.4: Verlauf einer GFV-Infektion [Quelle: Modrow, 2010 [39]].

Das *GFV* adsorbiert über unbekannte Rezeptoren an die Zielzelle und wird über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. Durch die Ansäuerung der Endosomen kommt es zu Umlagerungen der Virus-Envelope-Proteine, die eine Fusion der viralen mit der endosomalen Membran bewirkt. Das Capsid wird dabei in das Zytosol entlassen und zerfällt, sodass die virale RNA freigesetzt wird. Über die Cap-Struktur wird die Translation des Polyproteins initiiert, wobei ein Signalpeptid die Einlagerung der Membranproteine in die ER-Membran vermittelt. Das Polyprotein wird durch eine virale Protease sowie zelluläre Enzyme gespalten. Die entstandenen Nicht-Strukturproteine katalysieren die Produktion von negativsträngiger RNA, die wiederum als Matrize für die Herstellung neuer *GFV*-Genome dienen. Die neu synthetisierten Genome werden zum Teil zur Herstellung neuer Proteine und zum Einbau in neue Viruspartikel verwendet. Die Genome lagern sich an die Strukturproteine an und Viruspartikel buddieren in das ER-Lumen. Die entstandenen Partikel werden über den sekretorischen Weg ausgeschleust. Während des Transportes über den Golgi-Apparat kommt es zur Glykosylierung der E-Proteine sowie zur Spaltung der PrM-Proteine, wodurch vollständig entwickelte, infektiöse Partikel entstehen, die aus der Zelle ausgeschleust werden.

2.1.3 Nachweisverfahren

Für den Nachweis des *GFV* stehen sowohl direkte als auch indirekte Verfahren zur Verfügung. Die direkten Verfahren weisen das *GFV* direkt nach, sind also auf die Anwesenheit von Viruspartikeln im Blut angewiesen. Die indirekten Verfahren machen sich die Spezifität des Immunsystems zu Nutze, indem *GFV*-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, die nur in Folge einer Infektion mit dem Virus oder einer Impfung auftreten.

Das *GFV* zirkuliert etwa zwischen dem zweiten und siebten Tag nach einer Infektion oder Impfung im Blut der Patienten (siehe Tabelle 5.6 auf Seite 78) [55-57] und ist damit in diesem Zeitraum einem direkten Nachweis zugänglich.

Zu den direkten Verfahren zählt die Virusanzucht, bei der die Viren auf infizierbare Zellen gegeben werden, um sich zu vermehren. Abhängig von der Zellart kann es zu einem sogenannten zytopathischen Effekt kommen, der mikroskopisch sichtbare Veränderungen der Zellen bewirkt, die ein Hinweis auf eine Virusreplikation sind [58]. Eine Abwandlung dieser Methode stellt die Virustitration dar, die eine Bestimmung des Virustiters erlaubt (siehe 4.2.3.1 auf Seite 52).

Eine weitere direkte Methode stellt der Nachweis viraler Proteine dar, die sich mittels eines Western Blots oder eines ELISAs [59] nachweisen lassen. Beide Verfahren beruhen auf der Detektion der *GFV*-Proteine durch spezifische Antikörper. Der Nachweis dieser *GFV*-spezifischen Antikörper erfolgt über eine Fluoreszenzmarkierung der Antikörper oder über gekoppelte Enzyme, die eine sichtbare chemische Reaktion katalysieren.

Die PCR-basierten Prozeduren ermöglichen ebenfalls einen direkten Nachweis der Viren. Dazu wird das RNA-Genom aus den Viren extrahiert, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und mittels PCR-basierter Techniken hochspezifisch amplifiziert, bei Bedarf auch quantifiziert oder sequenziert. Auf Grund der hohen Sensitivität und Spezifität sowie der kurzen Bearbeitungszeit zählen die PCR-Techniken zu den Standardmethoden der Virusdiagnostik [60].

Der indirekte Nachweis über die gebildeten Antikörper ermöglicht eine erregerspezifische Detektion wenn das Virus bereits aus dem Blut eliminiert wurde. Antikörper lassen sich frühestens ab dem sechsten Tag nach der Infektion bzw. Impfung nachweisen (siehe Tabellen 5.7 und 5.9 auf den Seiten 81 bzw. 84) [55, 57, 61]. Bei dem indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT, siehe Kapitel 4.2.4.1 auf Seite 55) wird das zu untersuchende Serum auf fixierte, infizierte Zellen gegeben, sodass *GFV*-spezifische Antikörper an den Zellen binden können. Diese Antikörper werden wiederum durch einen zweiten, spezifisch

gegen IgM- oder IgG-Antikörper gerichteten sekundären Antikörper detektiert, der eine Fluoreszenzmarkierung trägt und somit mikroskopisch nachweisbar ist [62].

Eine sehr wichtige Methode für den indirekten Nachweis ist der Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT, siehe 4.2.4.2 auf Seite 56), da er die für die Schutzwirkung der Impfung entscheidenden neutralisierenden Antikörper nachweisen kann [63]. Bei diesem Test wird das zu untersuchende Serum seriell verdünnt und mit einer konstanten Menge an Viren auf Zellen gegeben. Durch die im Serum enthaltenen neutralisierenden Antikörper (AK) wird die Anzahl der infektiösen Partikel reduziert, was einen Rückschluss auf die Menge an Antikörpern im Serum zulässt. Ein Neutralisationstiter von 1:10 in dem eingesetzten Test wird als erfolgreiche Serokonversion und als ausreichender Schutz vor einer Infektion angesehen [64-66]. Der PRNT hat sich zusätzlich als der sensitivere Test im Vergleich zum IIFT herausgestellt, erfordert jedoch auch vier Tage Zeit [67].

2.1.4 Krankheitsverlauf

Das *GFV* verursacht ein hämorrhagisches Fieber, das zu den tödlichsten viralen Erkrankungen zählt [68].

Die Ausprägung der Erkrankung reicht von inapparenten bis hin zu letalen hämorrhagischen Verläufen, wobei geschätzt wird, dass bei einem epidemischen Ausbruch in Endemiegebieten 20-40 % der Population infiziert werden und etwa jeder siebte Infizierte auch Symptome entwickelt [69]. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass damit zu rechnen ist, dass in diesen Gebieten eine recht hohe Zahl an Infizierten bereits Antikörper gegen das *GFV* aus vorherigen Kontakten hatte und somit nicht erneut erkranken. Eine Aussage über die Wirkung einer Epidemie in einer naiven Population lässt sich aus diesen Zahlen nicht ableiten.

Nach der Übertragung des Virus durch den Stich einer infizierten Mücke beginnt eine dreiphasige Erkrankung. Nach drei bis sechs Tagen treten abrupt erste Symptome wie Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, Übelkeit und Schwindel auf. Zwei bis drei Tage nach der Infektion ist die höchste Viruskonzentration mit bis zu 10^7 PFU/mL im Blut nachweisbar [70]. In dieser Phase der Infektion können sich Mücken durch eine Blutmahlzeit an dem Patienten infizieren, wozu etwa 10^4 PFU/mL Blut ausreichend sind [71]. Während dieser Zeit tritt eine Leukozytopenie und zwei bis drei Tage vor der Ausprägung eines Ikterus ein Anstieg der Transaminasen im Serum der Patienten auf.

Diese erste Phase dauert etwa drei bis fünf Tage, worauf sich die zweite Phase anschließen kann, die mit einem Rückgang des Fiebers und den allgemeinen Symptomen bis zu 24 Stunden einhergeht. In diesem Zeitraum wird das Virus durch das Immunsystem aus dem

Blut der Patienten beseitigt. Etwa 85 % der Patienten erholen sich anschließend ohne in die dritte, toxische Phase der Erkrankung einzutreten.

Bei den übrigen Patienten kommt es zu einer drastischen Verschlechterung des Zustandes, der durch das Auftreten von Fieber, Erbrechen, abdominalen Schmerzen, Ikterus, Nierenversagen sowie Blutungen gekennzeichnet ist. Die massive Schädigung der Leber lässt sich durch die Erhöhung der Bilirubin- sowie der Transaminasenkonzentration im Serum nachweisen. Durch die Ausscheidung von Immunkomplexen kommt es zu einem Anstieg der Proteinkonzentration im Urin, wobei mit zunehmender Nierenschädigung die Urinmenge abnimmt und die Creatininkonzentration im Blut ansteigt. Die verminderte Produktion von Gerinnungsfaktoren in der Leber sowie eine disseminierte intravasale Koagulopathie führen zu verstärkten Blutungen sowie Multiorganversagen. Etwa 20-50 % dieser Patienten sterben innerhalb von sieben bis zehn Tagen nach der Infektion an Blutdruckabfall, Schock, Blutungen und Multiorganversagen. Patienten, die diese dritte Phase überleben genesen in der Regel ohne dauerhafte Folgen [57].

Die Gesamtsterberate bei einer Gelbfieberinfektion variiert sehr stark. Für Einheimische in Westafrika liegt sie bei Auftreten eines Ikterus um 20 %. In einer retrospektiven Analyse von neun nicht geimpften Reisenden aus den USA und Europa, die sich infiziert hatten lag die Rate bei 89 % [21]. Dies unterstreicht die Bedeutung der Impfprävention für Reisende in Endemiegebiete.

Die medizinische Intervention bei einer GF-Erkrankung beschränkt sich auch heute noch auf intensivmedizinische Unterstützung und Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen. Eine *GFV*-spezifische Therapie ist derzeit nicht verfügbar. Verschiedene Ansätze wie die Gabe von Immunmodulatoren oder Ribavirin wurden getestet, jedoch waren die Ergebnisse nicht eindeutig genug, um als generelle Therapieempfehlung gelten zu können [72]. Auf Grund der zunehmenden Fallzahlen ist die Notwendigkeit für die Entwicklung einer spezifischen Therapie trotz des wirksamen Impfstoffes weiterhin gegeben, da zum einen eine flächendeckende Impfung in den sich ausdehnenden Endemiegebieten kaum durchführbar ist und andererseits die Produktionskapazität des Impfstoffs bereits jetzt an ihre Grenzen stößt (siehe nächster Abschnitt 2.1.5).

2.1.5 Gelbfieberimpfung und Impfwischenfälle

Im Jahre 1936 entwickelten Max Theiler, Wray Lloyd und Hugh Smith durch die Passagierung des Asibi-Wildtypstammes auf verschiedenen Maus- und Hühnerembryozellen zufällig zwei attenuierte Impfstämme [13], wofür Theiler 1951 den Medizin Nobelpreis erhielt. In der 195. Passage trennten sich die beiden entwickelten Impfstämme, die als 17DD und 17D-204 (kurz 17D) bezeichnet werden. Der 17DD-Stamm wird heutzutage nur noch in Brasilien hergestellt, alle anderen eingesetzten Impfstämme gehen auf 17D-204 zurück. Spätere Versuche dieses Experiment zu wiederholen scheiterten, sodass der damals entwickelte Impfstoff auch heute weiterhin weltweit erfolgreich zur Eindämmung der Infektionen mit dem *GFV* Wildtypstamm eingesetzt wird [73]. Es konnte gezeigt werden, dass der Impfstoff gegen alle sieben existierenden Genotypen des Wildtypvirus wirksam ist [61]. Sequenzvergleiche zwischen den beiden Impfstammvarianten 17D und 17DD sowie Asibi zeigten insgesamt 20 konservierte Aminosäureaustausche sowie vier zusätzliche Nukleotidaustausche in dem 3'-nicht-translatierten Bereich in den Impfstämmen [74-76]. Auf Grund der Attenuierung des 17D-Impfstammes ist die Virusreplikation im Vergleich zu einer Wildtypinfektion deutlich verlangsamt, was dazu führt, dass deutlich niedrigere Virustiter im Blut auftreten (17D $<10^2$ PFU/mL, Asibi $<10^7$ PFU/mL).

Der parallel zum 17D-Impfstoff entwickelte „*french neurotropic vaccine*“-Stamm (*FNV*), der aus dem „*french viscerotropic virus*“ hervorgegangen ist, wurde 1971 vom Markt genommen, weil sich herausgestellt hat, dass es zu vermehrten neurologischen Nebenwirkungen kam [4].

Seit der Entdeckung des 17D-Impfstammes wurden schätzungsweise 540 Millionen Dosen verabreicht [77]. Der Impfstoff wird seither auf befruchteten Hühnereiern gezüchtet, was dazu führt, dass die aktuelle Jahresproduktion von etwa 30 bis 60 Millionen Dosen nicht kurzfristig erhöht werden kann [61, 71]. Dies hat bereits in der Vergangenheit zu Engpässen geführt, die sich durch die zunehmende Ausbreitung des Virus sowie die steigenden weltweiten Reiseaktivitäten auch in Zukunft verstärken werden. Um diesem Problem zu begegnen, gibt es Bestrebungen, den Impfstoff in Zukunft in einem Zellkultursystem anzuzüchten [78]. Außerdem gibt es Untersuchungen, die eine Umstellung der Verabreichungsform von subkutan auf intradermal testen, da dies im Vergleich nur ein Fünftel der Impfdosis erfordert [79].

Die Wirksamkeit des Impfstoffes ist exzellent. Deutlich mehr als 90 % der Erstimpfinge bauen nach 14 Tagen einen protektiven Antikörpertiter auf [21]. Die antikörperbasierte

Schutzwirkung konnte durch die passive Immunisierung und anschließende Infektion von Primaten gezeigt werden [80]. Obwohl die WHO eine Auffrischimpfung nach 10 Jahren empfiehlt [81], deuten Untersuchungen darauf hin, dass bei etwa 80 % der Geimpften auch noch 30 Jahre nach der Impfung ein ausreichender Titer vorhanden ist [65, 67]. Die Verträglichkeit des Impfstoffes ist ebenfalls gut. Leichte Nebenwirkungen wie Schwellungen, Rötungen oder leichtes Fieber treten bei etwa 25 % der Erstimpflinge auf. Allergische Reaktionen, die hauptsächlich durch Hühnereiweiß und Gelatine ausgelöst werden, müssen in einer von 131.000 Impfungen erwartet werden [82].

Die schweren Nebenwirkungen werden seit 2001 klinisch in neurotrope („yellow fever vaccine-associated neurotropic disease“ YEL-AND) und viscerotrope Zwischenfälle („yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease“ YEL-AVD) eingeteilt [61, 83]. Bis 2009 wurden weltweit 51 YEL-AVD [61] und 28 YEL-AND [84] verzeichnet.

YEL-AND zeichnen sich symptomatisch durch Fieber, Kopfschmerzen, neurologische Symptome, Enzephalitis, Meningoenzephalitis sowie Bewusstseinsveränderungen aus [61]. Diagnostisch relevante Anzeichen sind eine Erhöhung der Proteine (>1,5-fach) oder der Leukozyten (>5/mm³) in der Rückenmarksflüssigkeit (CSF) [61]. Ein sicherer Nachweis eines YEL-AND bei entsprechender Symptomatik ist der Nachweis von *GFV*-spezifischen IgM Antikörpern, Impfvirus oder viraler RNA im CSF [61, 85, 86]. Mit Ausnahme von einem Fall wurden alle neurologischen Zwischenfälle bei Erstimpfungen mit einer Inkubationszeit von 2 bis 23 Tagen registriert [14]. Für Erwachsene Erstimpflinge liegt das Risiko einer solchen Nebenwirkung bei 1:150.000-250.000 [82], bei Kindern unter einem Jahr deutlich höher [87, 88]. Die Letalität bei dieser Symptomatik liegt unter 5 %.

Viscerotrope Impfwischenfälle (YEL-AVD) sind durch Fieber, Muskel- und Gelenkschmerzen, Hepatitis, mittelschweres fokales Organversagen bis hin zu Multiorganversagen mit Hämorrhagien gekennzeichnet. Die Symptome ähneln somit denen einer Infektion mit dem *GFV* Wildtypstamm. Diagnostisch relevante Veränderungen sind erhöhte Leberenzyme und Thrombocytopenie [61]. Die Inkubationszeit liegt bei etwa zwei bis fünf Tagen, die Letalität mit über 60 % deutlich über der für neurologische Impfwischenfälle. Die Häufigkeit der YEL-AVD wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:200.000-300.000 beobachtet [82]. Um genauere Daten über das Auftreten von Impfwischenfällen zu gewinnen, ist es notwendig, in Massenimpfkampagnen eine funktionierende Erfassungsroutine zu integrieren [89, 90].

Die Wirksamkeit des 17D-Impfstoffes möchte man sich auch für andere Impfstoffe zu nutze machen. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist die Oberflächenproteine des 17D-Impfstoffes gegen die entsprechenden Proteine andere *Flaviviren* auszutauschen. Die

entstehenden Chimären-Impfstoffe lösen eine Immunreaktion gegen die neu eingefügten Oberflächenproteine aus. Aus diesem Grund ist das Verständnis der Immunreaktion sowie der Ursachen für das Auftreten von Impfwischenfällen von besonderer Bedeutung, um die Sicherheit neuer Impfstoffe zu gewährleisten. Diese als ChimeriVax™ bezeichnete Technik wurde eingesetzt, um Impfstoffe gegen das *Dengue*-, *West-Nil*- und *Japanische Enzephalitisvirus* herzustellen, die sich in verschiedenen Stufen der klinischen Erprobung befinden [91].

2.1.6 Immunreaktion auf das GFV

Neutralisierende Antikörper werden als die Hauptvermittler der Schutzwirkung einer Impfung angesehen, da sie in der Lage sind eindringende Viren schnell abzufangen [55, 61]. Gezeigt wurde dies durch die passive Immunisierung von Primaten, die eine anschließende Infektion mit dem GFV ohne Erkrankung überstanden [80]. Für die Eliminierung einer Infektion ist zusätzlich eine ausgeprägte zelluläre Immunantwort notwendig, die speziell über cytotoxische CD8⁺ T-Zellen eine Vernichtung infizierter Zellen bewirkt [92]. Seit einigen Jahren wird ein Zusammenhang zwischen der angeborenen Immunantwort und der Ausrichtung sowie der Stärke der adaptiven Immunantwort bestätigt [93-95], sodass beide Systeme als eng verzahntes Ganzes angesehen werden müssen. Wichtige Mediatoren zwischen den einzelnen Immunzellen sind die Zytokine. Sie sind Proteine oder Glykoproteine und werden von Leukozyten produziert. Über spezifische Rezeptoren lösen sie Wirkungen in anderen Zellen aus. Eine Unterklasse der Zytokine sind die sogenannten Chemokine, deren Name sich aus ihrer Funktion als chemotaktisches, also Zellen anlockendes, Zytokin herleitet [96].

In der folgenden Tabelle 2.1 sind die in der Impfstudie untersuchten Zytokine mit ihrer Hauptfunktion dargestellt.

Tabelle 2.1: Aufstellung der untersuchten Zytokine in der Impfstudie.

Aufgeführt sind die gängigen Abkürzungen, der vollständige Name sowie die Hauptfunktionen der untersuchten Zytokine.

Zytokin	Name	Hauptfunktion
Eotaxin		Chemokin für eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, T _H 2-Zellen
Eotaxin-2		Chemokin für eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, T _H 2-Zellen
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor	Stimuliert das Knochenmark zur Produktion von Granulozyten/Stammzellen
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor	Wachstumsfaktor für Leukozyten, besonders Granulozyten/Monozyten
sICAM-1	soluble intercellular adhesion molecule 1	Negativer Regulator der Zelladhäsion über ICAM-1/LFA-1, Induktion der Expression von proinflammatorischen Zytokinen
IFN _γ	Interferon gamma	Typ II Interferon, Aktivierung von Makrophagen, NK- und T-Zellen, reguliert B-Zell Aktivierung, hemmt T _H 2-Ausrichtung
I-309		Chemokin für Monozyten
IL-1 _α	Interleukin-1 _α	Mediator der akuten Entzündungsreaktion, Fieber, leitet DZ in Lymphknoten
IL-1 _β	Interleukin-1 _β	Mediator der akuten Entzündungsreaktion, Fieber, leitet DZ in Lymphknoten
IL-2	Interleukin-2	Wachstumsfaktor für Antigen stimulierte T-Zellen → klonale Expansion
IL-3	Interleukin-3	Haematopoese → Reifung B-Zellen und Monozyten
IL-4	Interleukin-4	Fördert die Proliferation und Differenzierung von aktivierten B-Zellen, Antikörperklassenwechsel zu IgE
IL-6	Interleukin-6	Bewirkt in Hepatozyten die Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen, verursacht Fieber, Wachstums- und Differenzierungsfaktor für T- und B-Zellen, leitet DZ in Lymphknoten
IL-6 sR	Interleukin-6 soluble receptor	Negativer Regulator für IL-6
IL-7	Interleukin-7	Differenzierung und Proliferation von lymphoiden Vorläuferzellen, Entwicklung und Homöostase
IL-8	Interleukin-8	Chemokin für neutrophile Granulozyten
IL-10	Interleukin-10	Inhibiert aktivierte Makrophagen, hemmt IL-12 Produktion von aktivierten Makrophagen, hemmt T-Zellaktivierung durch reduzierte Expression costimulatorischer Faktoren auf Makrophagen
IL-11	Interleukin-11	Bewirkt in Hepatozyten die Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen
IL-12p40	Interleukin-12p40	Wichtigstes proinflammatorisches Zytokin gegen intrazelluläre Erreger, stimuliert IFN _γ Produktion über T- und NK-Zellaktivierung, Differenzierung zu T _H 1-Helferzellen
IL-12p70	Interleukin-12p70	Wichtigstes proinflammatorisches Zytokin gegen intrazelluläre Erreger, stimuliert IFN _γ Produktion über T- und NK-Zellaktivierung, Differenzierung zu T _H 1-Helferzellen
IL-13	Interleukin-13	Wachstum und Differenzierung von B-Zellen, hemmt T _H 1-Ausrichtung
IL-15	Interleukin-15	Induziert NK-Zellproduktion, aktiviert Makrophagen
IL-16	Interleukin-16	Chemokin für CD4 ⁺ T-Zellen
IL-17	Interleukin-17	Regulation der Angiogenese
IP-10	interferon-inducible protein-10	Chemokin für Effektor T-Zellen
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1	Chemokin für Leukozyten
MCP-2	monocyte chemoattractant protein-2	Chemokin für Leukozyten

Zytokin	Name	Hauptfunktion
M-CSF	macrophage/monocyte colony stimulating factor	Stimuliert haematopoetische Stammzellen zur Differenzierung in Makrophagen
MIG	monokine induced by gamma-Interferon	Chemokin für Effektor T-Zellen
MIP-1 α	macrophage inflammatory protein 1 α	Chemokin für Leukozyten
MIP-1 β	macrophage inflammatory protein 1 β	Chemokin für T-Zellen, DZ, Monozyten, NK-Zellen
MIP-1 δ	macrophage inflammatory protein 1 δ	Chemokin für Leukozyten
RANTES	regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted	Chemokin für Leukozyten
TGF β 1	transforming growth factor-beta1	Hemmt die Proliferation und Aktivierung von Leukozyten
TNF α	tumor necrosis factor- α	Mediator der akuten Entzündungsreaktion, Fieber, leitet DZ in Lymphknoten
TNF β	tumor necrosis factor- β	Mediator der akuten Entzündungsreaktion, Fieber, leitet DZ in Lymphknoten
sTNF-RI	soluble TNF receptor I	Regulation des TNF-Systems
sTNF-RII	soluble TNF receptor II	Regulation des TNF-Systems
PDGF-BB	platelet-derived growth factor-BB	Reguliert Angiogenese
TIMP-2	tissue inhibitor of metalloproteinases-2	Hemmt Metalloproteasen

T_H1/2-Zellen – CD4⁺ T-Helferzellen mit T_H1/2 Ausprägung, NK-Zellen – natürliche Killerzellen, DZ – dendritische Zellen

Durch die Impfung gelangt das *GFV* in das Gewebe des Menschen. Es konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen [97] infizierbar sind und somit für eine erste Vermehrung der Viren dienen können. Sie schütten als Reaktion auf eine Infektion unter anderem das Zytokin RANTES aus und locken damit verschiedene Immunzellen wie z.B. natürliche Killerzellen und dendritische Zellen (DZ) zum Infektionsort [98], um die Virusverbreitung einzudämmen. Makrophagen, Monozyten [99] und sehr wahrscheinlich dendritische Zellen [100-103] sind ebenfalls infizierbar und dienen im Fortgang der Infektion als Transportmöglichkeit der Viren in die Lymphknoten, wo sie auf eine große Menge an infizierbaren Zellen treffen. Die verstärkte Replikation führt zu einer Virämie im Blut, in deren Verlauf weitere Immunzellen und verschiedene Organen [104] infiziert werden.

Im Bereich der Erstinfektion sorgen Makrophagen, angelockte neutrophile Granulozyten sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) für eine erste Eindämmung der Infektion. Makrophagen und Granulozyten können freie Erreger aufnehmen und verdauen [105], NK-Zellen in gewissem Umfang infizierte Zellen zerstören. Sie besitzen konservierte Rezeptoren mit denen sie Zellen auf ihren „Gesundheitszustand“ überprüfen können. Ist eine

Zelle mutiert oder infiziert, so kann dies zu Konzentrationsveränderungen ihrer Oberflächenproteine führen und eine Aktivierung der Killerzellen bewirken [106]. Abhängig von der Subpopulation reagieren die NK-Zellen unterschiedlich auf die Aktivierung durch unnormale Zellkontakte. $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ Zellen schütten $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ aus, um die Immunreaktion zu verstärken. $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ NK-Zellen agieren zytolytisch mit der Ausschüttung von Perforin und Granzym, was zur Zerstörung der Zelle führt [106].

Entscheidend für die Erkennung der Pathogene am Infektionsort sind dendritische Zellen, die überall im Körper verteilt sind und ihre Umgebung ständig auf Krankheitserreger untersuchen. Sie sind mit verschiedenen Rezeptorklassen ausgestattet, die eine unspezifische Erkennung von Pathogenen erlauben und spielen damit eine Schlüsselrolle in der Immunantwort. Eine dieser Rezeptorklassen sind die sogenannten „Toll-like“ Rezeptoren (TLR), von denen elf Varianten in Säugetieren bekannt sind [94, 100, 107, 108]. Die TLRs erkennen unterschiedliche, mit Pathogenen assoziierte Strukturen, wie z.B. unmethylierte DNA aus Bakterien und Viren (TLR9) [109, 110] oder Zymosan aus Hefezellen (TLR2) [111]. Es konnte gezeigt werden, dass *GFV* 17D unreife dendritische Zellen (DZ) über die TLRs 7 und 8 aktiviert, die das einzelsträngige RNA-Genom [112-114] erkennen. Beide Rezeptoren treten auch in Endosomenmembranen auf, sodass das Virus-Genom nach der Lyse in den Endosomen für die Rezeptoren zugänglich wird [115]. Aktivierte myeloide dendritische Zellen (mDZ) prozessieren die aufgenommenen Pathogene für die Präsentation auf MHC II-Molekülen („major histocompatibility complex“) und sind zusätzlich mit costimulatorischen Rezeptoren ausgestattet, die eine sehr effektive Stimulation der adaptiven Immunantwort erlauben. Sie wandern über Lymphgefäße in die nächstgelegenen Lymphknoten, um dort in Kontakt mit naiven T-Zellen zu kommen. Plasmazytoide dendritische Zellen (pDZ) sind weniger gute antigenpräsentierende Zellen, sie schütten nach der Aufnahme von Krankheitserregern große Mengen an $IFN\alpha$ aus und aktivieren darüber antivirale Mechanismen in den umliegenden Zellen, um die Vermehrung der Viren zu behindern. Zu den Effekten gehört z.B. die Expression von Endonukleasen zum Abbau viraler Genome sowie von Kinasen, die hemmend auf die gesamte Proteinbiosynthese der Zelle einwirken. Eine weitere wichtige Funktion des $IFN\alpha$ ist die Hochregulierung der Expression von MHC I-Molekülen auf den Zellen, die eine bessere Präsentation der Zellinhalte und damit ggf. auch der vorhandenen viralen Proteine ermöglichen.

In den Lymphknoten präsentieren hauptsächlich die mDZ Peptidfragmente der aufgenommenen Viren über MHC II-Komplexe und sind somit in der Lage vorbeiwandernde $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen mit dem passenden T-Zellrezeptor zu aktivieren. Werden naive

CD4⁺ T-Helferzellen von den mDZ aktiviert, können sie sich nach der Proliferation in zwei verschiedene Richtungen entwickeln. T_H1-Helferzellen sezernieren primär IFN_γ, IL-2 und TNF_α und polarisieren die Immunantwort in Richtung der Abwehr intrazellulärer Erreger. T_H2-Helferzellen bewirken eher eine Fokussierung auf extrazelluläre Erreger und sezernieren Zytokine wie IL-4/-5/-6/-10/-13 [116]. Für die jeweilige Differenzierungsrichtung sind wiederum die in der Umgebung der T-Helferzellen vorhandenen Zytokine verantwortlich. IL-12 und IFN_γ bewirken eine T_H1 Ausrichtung, IL-4 und IL-6 eine T_H2 Präferenz. Es konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit der aktivierten TLRs und der Subpopulation der dendritischen Zellen unterschiedliche Zytokinexpressionsmuster aktiviert werden [94, 107, 108]. Die DZ sind daher für die Ausrichtung der adaptiven Immunantwort essentiell. Die Aktivierung über die TLR8/9, wie sie für das GFV gezeigt wurde, bewirkt in mDZ eine IL-12 Ausschüttung [110, 117] und in pDZ die Expression von IFN_α [118, 119]. Anhand der TLR-Aktivierung sollte somit eine T_H1-Antwort ausgebildet werden. Untersuchungen zeigen jedoch eine gemischte T_H1/T_H2-Antwort [56, 120, 121], die eventuell auf nicht virale, ebenfalls immunogene Bestandteile des Impfstoffes zurückzuführen ist und damit zu einer breiteren Aktivierung des Immunsystems beitragen könnten [100]. Im GF-Impfstoff wurden beispielsweise Proteine von Vogel Retroviren, Ovalbumin sowie Hühner-DNA gefunden [122].

Die aktivierten und ausdifferenzierten reifen CD4⁺ T-Helferzellen sind in den Lymphknoten für die Aktivierung der B-Zellen verantwortlich. Die Plasmablasten, naive B-Zellen, zirkulieren durch den Körper und nehmen das passenden Antigen bei Kontakt auf. Gelangen diese Zellen in den Lymphknoten an eine aktivierte CD4⁺ T-Helferzelle mit dem gleichen Antigen, so wird die B-Zelle aktiviert, was zunächst die Proliferation und anschließend die Differenzierung in Plasmazellen bewirkt, deren Aufgabe die Antikörperproduktion ist. Im Fortgang der Infektion kommt es bei den B-Zellen noch zu Veränderungen der Antigenbindungsaffinität sowie zu einem Wechsel der produzierten Antikörperklasse, von anfangs IgM- zu hauptsächlich IgG-Antikörpern bei viralen Infektionen. Mit dem Auftreten der Antikörper im Blut, ab etwa dem siebten Tag nach der Infektion, werden die Viren abgefangen und die Virämie wird unterdrückt.

Ebenso wie die CD4⁺ T-Helferzellen, zirkulieren auch die naiven CD8⁺ T-Zellen unablässig durch den Körper und passieren dabei die Lymphknoten mit den aktivierten mDZ. Kommt es zu einer Interaktion zwischen dem T-Zellrezeptor einer naiven CD8⁺ T-Zelle mit dem an ein MHC II-Molekül gekoppelten Antigen so wird die T-Zelle aktiviert. Sie proliferiert und entwickelt sich zu einer Effektorzelle.

Die in den Lymphknoten aktivierten, reifen T-Zellen verlassen zum Teil den Lymphknoten und werden durch spezifische Chemokine zum Infektionsort dirigiert, um dort Effektorfunktionen auszuführen. Reife CD4⁺ T_H1-Zellen, die sich am Infektionsort befinden, sind durch die Sezernierung der Zytokine TNF α und IFN γ in der Lage, Makrophagen zu aktivieren und dadurch ihre Fähigkeit zu erhöhen, phagozytierte Partikel zu vernichten. Des Weiteren werden B-Zellen zur Produktion von opsonisierenden Antikörpern, hauptsächlich der Klassen IgG1 und IgG3, angeregt. T_H2-Zellen regen die Produktion von neutralisierenden Antikörpern an, was extrazelluläre Erreger effektiv bekämpft.

Die reifen CD8⁺ T-Zellen erkennen infizierte Zellen über die auf MHC I-Molekülen präsentierten Peptide und zerstören diese, um die Virusvermehrung zu unterbinden.

Durch die Eliminierung der Viren aus dem Blut und die Zerstörung infizierter Zellen ist die akute Infektion abgewehrt. Einige der aktivierten T- und B-Zellen entwickeln sich zu Gedächtniszellen und stellen damit sehr langlebige Zellpopulationen dar, die die Aufgabe haben bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger eine deutlich schnellere und von Anfang an hoch spezifische Immunantwort auszulösen. Beim GFV bietet der Antikörpertiter auch Jahrzehnten nach der Impfung bei etwa 80 % der Geimpften einen ausreichenden Schutz [65, 67].

2.2 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist eine für die Molekularbiologie bahnbrechende Entdeckung, da sie die gezielte, sequenzspezifische Unterdrückung von Genexpressionen ermöglicht. Fire *et al.* entdeckten, dass die Einschleusung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in *Caenorhabditis elegans* gezielt Gene unterdrücken kann [123], wofür sie 2006 den Nobelpreis erhielten. Es stellte sich heraus, dass dieser Mechanismus einen evolutionär konservierten Abwehrmechanismus vieler Spezies gegen invasive Nukleinsäuren wie Transposons, Viren und andere Pathogene darstellt [124, 125]. Die gezielte Genunterdrückung in Säugetierzellen gelang erstmals 2001 [126]. Entscheidend für diesen Durchbruch war der Einsatz sehr kurzer, etwa 21 Nukleotide langer dsRNAs, die auch als small interfering RNA (siRNA) bezeichnet werden. Sie sind in der Lage über einen zellulären Proteinkomplex sequenzspezifisch RNAs zu zerstören. Es stellte sich heraus, dass der gleiche Mechanismus in Zellen zur post-transkriptionalen Genregulation vorkommt. Die von der Zelle exprimierten microRNA (miRNA) werden dabei von dem gleichen Proteinkomplex gebunden, der die kleinen RNA-Fragmente als Erkennungssequenz für die zu spaltende RNA-Moleküle nutzt.

2.2.1 Funktionsweise der RNA-Interferenz

Die Vorläufer microRNAs (pri-miRNA) entstehen aus zellulären RNA-Transkripten, die sich durch die Bildung von Haarnadel-Strukturen auszeichnen, wie in der folgenden Abbildung 2.5 gezeigt. Die Transkription wird entweder durch spezifische Promotoren oder durch die Promotoren der Gene, in denen die pri-miRNAs lokalisiert sind, reguliert. Die Transkription erfolgt durch die RNA-Polymerasen II oder III. Im Nucleus wird die pri-miRNA durch einen Proteinkomplex aus Drosha und DGCR8 gebunden und die pre-miRNA durch Spaltung erzeugt (siehe Abbildung 2.5). Nach der Ausschleusung aus dem Zellkern wird die pre-miRNA von einem dsRNA-bindenden Protein (TRBP) erkannt und in Verbindung mit der RNase Dicer in ein 21-23 bp kleines dsRNA-Fragment mit einem zwei Nukleotide langen 3'-Überhang geschnitten [127]. Die erzeugten miRNAs werden von dem sogenannten „RISC loading complex“ (RLC) gebunden, der aus den Proteinen Dicer und R2D2 besteht. Der RLC vermittelt die Beladung des RISC-Multiprotein-Komplexes („RNA-induced silencing complex“) der sich um das Argonaute-Protein formt. Einer der beiden RNA-Stränge wird durch den Komplex abgebaut, die Auswahl dieses Stranges erfolgt über die thermodynamischen Eigenschaften der beiden Einzelstränge. Die Berücksichtigung dieser Tatsache ermöglicht es bei dem Design von siRNAs gezielt den richtigen Einzelstrang in den RISC zu laden, wobei auch der thermodynamisch ungünstigere Strang in eine geringere Zahl von RISC geladen wird. Der beladene Komplex bindet an komplementäre RNA-Moleküle. Es kommt daraufhin entweder zur Spaltung des RNA-Moleküls mit anschließender Degradation der Fragmente oder zu einer Inhibition der Translation über die Blockierung der mRNA ohne Spaltung [128, 129]. Ist die Zielsequenz innerhalb einer mRNA lokalisiert, so kommt es durch die Reduktion der mRNA-Konzentration in der Zelle ebenfalls zu einer reduzierten Proteinexpression.

Der Unterschied zwischen dem siRNA-Weg und dem endogenen miRNA-Weg besteht nur in dem Ursprung der RNA-Moleküle. Die beteiligten Komponenten sind für beide Mechanismen identisch.

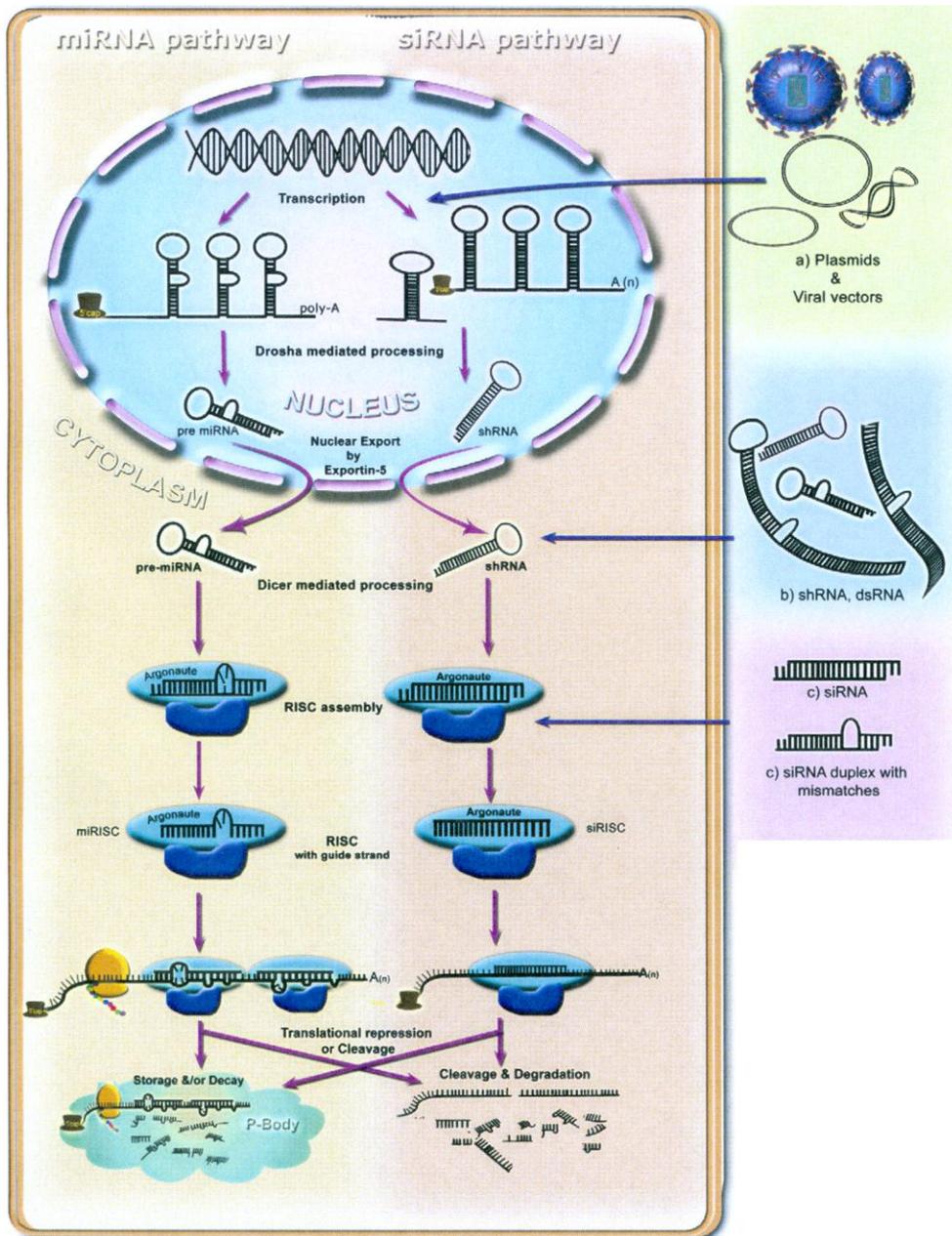


Abbildung 2.5: Mechanismus der RNA-Interferenz [Quelle: verändert nach Hajeri und Singh, 2009 [130]].
 Dargestellt ist der Ablauf der miRNA oder siRNA gesteuerten Unterdrückung einer Genfunktion. Gentranskripte oder Transkripte von exogenen viralen Vektoren oder Plasmiden (a) werden im Zellkern über Haarnadelstrukturen erkannt und durch Drosha geschnitten. Im Zytoplasma erfolgt die Erzeugung der 21-23 Nukleotide langen mi- oder siRNA durch das Enzym Dicer aus pre-miRNA oder „short hairpin“ RNA, die in Form von dsRNA oder shRNA auch künstlich in die Zellen transfiziert werden kann (b). Die mi- oder siRNAs werden in den „RNA induced silencing complex“ (RISC) aufgenommen indem ein RNA-Strang abgebaut wird, was zu einem aktivierten RISC führt. Auf dieser Ebene können ebenfalls die siRNAs in die Zelle transfiziert werden, um in den RISC aufgenommen zu werden (c). Der aktive Komplex führt durch Bindung oder Spaltung der komplementären Sequenz in RNA Molekülen zur Unterdrückung der entsprechenden Genfunktion.

2.2.2 Therapeutische Potential von RNAi

RNA-Interferenz (RNAi) ist in der Wissenschaft eine sehr erfolgreiche Methode zur Unterdrückung von Genfunktionen. Sie stellt somit einen potentiellen therapeutischen Ansatz für Erkrankungen dar, die durch eine zu starke Expression eines bestimmten Gens hervorgerufen werden, wie es z.B. bei Viruserkrankungen, Krebs oder Entzündungskrankheiten der Fall ist. In Zellkulturstudien wurden sehr gute Ergebnisse mit RNA-Interferenz gegen Oncogene oder gegen virale Gene von *HI*-, *Influenza*- und *Polioviren* erreicht [131-134]. Prinzipiell kann ein Effekt über die Verabreichung von siRNAs, shRNAs oder dsRNAs (Abbildung 2.5 b und c) erreicht werden, jedoch sind diese im Körper nicht stabil. Dieses Problem kann durch chemische Modifikationen umgangen werden, die eine Resistenz gegen RNasen vermitteln [135]. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der zielgenauen Verabreichung der siRNAs in bestimmte Zellen. Um dies zu erreichen, stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, die jedoch bei der Anwendung im Menschen nicht risikolos sind (siehe auch Seite 143).

Bereits erfolgreich eingesetzt wird RNAi bei der Therapie von altersbedingter Makuladegeneration. Die siRNA wird dabei direkt in den Glaskörper des Auges gespritzt. Durch die fehlende Durchblutung ist eine ausreichend lange Verweildauer des Präparats im Auge möglich, sodass die Einschleusung in die Netzhaut erfolgt. Ziel der siRNA ist die mRNA des VEGFR-1 („vascular endothelial growth factor receptor-1“), ein Rezeptor der auf Zytokine reagiert, die eine Blutgefäßneubildung anregen. Durch die Unterdrückung der Expression des Rezeptors konnte eine Verbesserung bei den Patienten festgestellt werden [136].

Die hemmende Wirkung der siRNA gegen die Replikation von *Flaviviren* wurde bereits in einigen Studien gezeigt. Kumar *et al.* belegte in Mäusen sowohl über einen lentiviralen Expressionsvektor als auch über die Verabreichung von synthetischer siRNA eine positive Wirkung bei einer West-Nil- und Japanischen Enzephalitis-Virusinfektion [137]. Die Hemmung der *GFV*-Replikation konnte in Mäusen mit einem plasmidbasierten System *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden [138]. Besonders im Hinblick auf die zunehmende Verbreitung der *Aedes*-Mücken verfolgen Travanti *et al.* einen sehr interessanten Ansatz. Sie untersuchten die Möglichkeit Mücken genetisch so zu verändern, dass sie konstitutiv siRNA gegen das Dengue-Virus exprimieren und somit eine Übertragung unterbunden wird [139].

Die RNAi stellt somit neben dem wissenschaftlichen Einsatz auch eine vielversprechende Möglichkeit zur Intervention bei einer Virusinfektion dar.

3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll ein umfassender Einblick in die Immunreaktion gesunder Impflinge nach einer Gelbfieberimpfung gewonnen werden. Die Analyse schließt die Charakterisierung der Virusreplikation, der Bildung spezifischer Antikörper sowie der Zellkommunikation innerhalb des Immunsystems über die ausgeschütteten Zytokine ein. In enger Kooperation mit dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin (AG Andreas Thiel) werden umfangreiche Untersuchungen zur zellulären Immunantwort durchgeführt.

Zusätzlich zu den Untersuchungen an gesunden Probanden werden Verdachtsfälle schwerer Impfwischenfälle aus drei Impfkampagnen der WHO in afrikanischen Ländern analysiert. Ziel dabei ist es, weitere Informationen über den Schweregrad sowie mögliche Ursachen dieser Fälle zu gewinnen. Die gewonnenen Daten aus diesen beiden Forschungsschwerpunkten sollen als Basis für die Untersuchung der Ursachen von schweren Impfwischenfällen in späteren Projekten dienen.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit ist die *in vitro* Untersuchung der Wirkung von *GFV*-spezifischen siRNAs auf die Virusreplikation. Die *in silico* identifizierten siRNA-Zielsequenzen sollen in einem Zellkultursystem auf eine virusreplikationshemmende Wirkung untersucht werden. Wichtiger Bestandteil der Untersuchung ist dabei die Wirkung auf den *GFV* Asibi-Wildtypstamm, da dies für einen Ansatz als antivirale Therapie maßgeblich ist.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

4.1.1.1 Geräte

Analysenwaage (BP 310 p)

Sartorius, Göttingen

Auftragsschablone für Antikörper im IIFT/IFT

EUROIMMUN, Lübeck

Autoklaven:

- Automat 21/2
- Varioklav[®]

Webeco, Bad Schwartau
H+P Labortechnik,
Oberschleißheim

Brutschränke:

- für Bakterienkultur (mit Schüttler)
- für Zellkultur

New Brunswick Scientific,
Edison, USA
Heraeus, Hanau
Sanyo, Osaka, Japan

Chemolumineszenzreader Chemi-Smart 3000

Vilber Lourmat,
Eberhardzell

Färbeküvette

Carl Roth, Karlsruhe

FACS LSRII

Becton Dickinson GmbH,
Heidelberg

Gefrierschränke:

- -20 °C
- -80 °C

Bosch, Stuttgart
Liebherr, Biberach a.d. Riß
Heraeus, Hanau

Geldokumentationsgerät

PEQLAB, Erlangen

Gelelektrophoresesysteme

Biozym, Oldendorf

Glaswaren (Kolben, Flaschen etc.)

Schott Glas, Mainz

Heizplatte/Magnetrührer:

- IKA[®] RH basic 2
- IKA KM02

Ika Werk, Staufen

Ika Werk, Staufen

Inkubator

Heraeus, Hanau

Kühlschränke	Bosch, Stuttgart Philipp Kirsch, Offenburg
Mikroskope:	
• Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200)	Carl Zeiss, Jena
• Invertmikroskop Telaval 3	Carl Zeiss, Jena
• EUROStarII	EUROIMMUN, Lübeck
• AE21	Motic, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Photometer (Bio-Photometer)	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte, Berlin
Pinzetten (diverse)	Carl Roth, Karlsruhe
Pipetten (bis 10 µL, 100 µL, 1.000 µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Accujet®)	Brand, Wertheim
Sequencer 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen Bio-Rad, München Carl Roth, Karlsruhe
Spatel (diverse)	
Sterilarbeitsbänke:	
• antair BSK	Kendro, Langenselbold
• BioGard Hood	Baker Company, Sanford, USA
• HeraSave	Heraeus, Hanau
Stickstoffprobenlagerungstank	Union Carbide, Houston, USA
Temperierbad	Recker Laborbedarf, Berlin
Thermoblock (Thermomixer comfort)	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler:	
• Biometra T Gradient	Biometra, Göttingen
• Biometra T Personal	Biometra, Göttingen
• Biometra T Professional Basic Gradient	Biometra, Göttingen
• Stratagene MX3000P / MX3005P	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
Tiefkühlbox für TaqMan®-Platten mit Aluminium-Block	Nunc, Wiesbaden

UV-Tisch (Transilluminator TC-312A)	Spectroline, Westbury, USA
Vortex [®]	Carl Roth, Karlsruhe
Zentrifugen:	
• 1-13	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
• 1-15 K	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
• 3-K30 C	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
• Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
• Heraeus Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
• Heraeus Multifuge [®] 3S/3S-R	Heraeus, Hanau
• Sigma 2K15 Kühlzentrifuge	B. Braun, Melsungen
• Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau

4.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Blutabnahmezubehör:

• Natriumheparin-Röhrchen 170 I.U. 10 mL	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
• Serum-Röhrchen CAT 6 mL	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
• Flügelkanülen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
• Adapter	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Deckel für TaqMan[®]-Platten (8er-Streifen)

Deckgläser für OT
Waldemar Knittel
Glasbearbeitung,
Braunschweig
EUROIMMUN, Lübeck

Einwegküvetten
Eppendorf, Hamburg

Einwegküvetten (UV durchlässig)
Eppendorf, Hamburg

Einwegspritzen
B. Braun, Melsungen

Kryogefäße (1,8 mL mit Innengewinde)
Nunc, Wiesbaden

Lochplatten (24er)
Nunc, Wiesbaden

Lochplatten (6er)
Nunc, Wiesbaden

Objekträger	Carl Roth, Karlsruhe
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen mit Aerosolschutz (10 µL, 100 µL, 1.000 µL)	Biozym, Oldenburg
Pipettenspitzen ohne Aerosolschutz (10 µL, 100 µL, 1.000 µL)	Eppendorf, Hamburg
PCR-Platten: 96er; 0,2 mL (für TaqMan®-PCR)	Abgene, Epsom, UK
PCR-Reaktionsgefäße:	
• 0,2 mL; 0,5 mL	Biozym, Oldendorf Eppendorf, Hamburg Nunc, Wiesbaden
• 0,2 mL; 8er-Streifen	Biozym, Oldenburg
Polystyrol-Gefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Quadripermschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße:	
• 0,5 mL; 1,5 mL; 2,0 mL	Eppendorf, Hamburg
• 15 mL; 50 mL	Nunc, Wiesbaden
• 12 mL Rundboden Cellstar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
• 5 mL Rundboden	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Seropipetten (1 mL; 5 mL; 10 mL; 25 mL, 50 mL)	Nunc, Wiesbaden
Sterilfilter (0,22 und 0,45 µm)	Carl Roth, Karlsruhe
TruCount-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturflaschen mit/ohne Filterdeckel (25 cm ² ; 75 cm ² ; 175 cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	TPP, Trasadingen, CH

4.1.2 Chemikalien

3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, München
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche, Grenzach-Wyhlen
6-Carboxy-X-Rhodamin (ROX)	Invitrogen, Karlsruhe
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose (NuSieve [®] 3:1)	Biozym, Oldendorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Bacto Trypton	Bacto Laboratories, Liverpool, UK
Bacto Hefeextrakt	Bacto Laboratories, Liverpool, UK
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Bovines Serum Albumin-Lösung (100x)	New England Biolabs [®] , Ipswich, USA
Brefeldin A (5 mg/mL in 70 % Ethanol)	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau (Tetrabromphenolsulfonphthalein)	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Carboxymethylcellulose (CMC)	BDH Chemicals Ltd., Poole, England
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleosidtriphosphate-Mix (dNTP-Mix)	Eppendorf, Hamburg
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Serva, Heidelberg
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol endotoxinfrei	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Qiagen, Hilden
Fötales Kälberserum (FKS)	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	PAA Laboratories, Linz, A
FuGENE [®]	Carl Roth, Karlsruhe
GeneJuice [®]	Roche, Grenzach-Wyhlen
Glukose	Merck, Darmstadt
	Carl Roth, Karlsruhe

Glycerin	Merck, Darmstadt
	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, München
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
λ -DNA	Fermentas, St. Leon-Rot
L-Glutamin	PAA Laboratories, Linz, A
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchloridlösung (50 mM)	Eppendorf, Hamburg
	Invitrogen, Karlsruhe
Manganchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Ribonukleosidtriphosphate-Mix (NTP-Mix)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Mix	PAA Laboratories, Linz, A
Poly-L-Lysin Lösung (0,01 %)	Sigma-Aldrich, München
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich, München
Select Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Wasser (molekularbiologischer Standard)	Eppendorf, Hamburg

4.1.3 Enzyme und Inhibitoren

Platinum® <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ μ L)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Pst</i> I Restriktionsenzym (20 U/ μ L)	New England Biolabs®, Ipswich, USA
Trypsin	PAA Laboratories, Linz, A
RNase Out (RNase-Inhibitor) (40U/ μ L)	Invitrogen, Karlsruhe
	Promega, Mannheim
M-MLV RT (200 U/ μ L)	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript™ III Reverse Transkriptase (200 U/ μ L)	Invitrogen, Karlsruhe

4.1.4 Puffer und Lösungen

Diluent	8 g NaCl 0,4 g KCl 0,06 g NaH ₂ PO ₃ 0,06 g KH ₂ PO ₃ 1 g Glukose 0,375 g NaHCO ₃ auf pH 7 einstellen Zugabe von 0,2 % EDTA
DNA-Probenpuffer (6x)	6 mL Glycerin 40 mg Bromphenolblau gelöst in 5 mL TBE (1x)
FACS Lysing Solution	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS Permeabilizing Solution	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Lysing Buffer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Naphthalin Schwarz	1 g Amidoschwarz 13,6 g Natriumacetat 60 mL Eisessig auf 1.000 mL Wasser auffüllen
PCR-Puffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	140 mM NaCl 2 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
PBS/BSA-Puffer	PBS mit 5 g/L BSA

PBS/BSA/EDTA-Puffer	PBS/BSA-Puffer mit 2 mM EDTA
Puffer für Restriktionsenzyme	New England Biolabs [®] , Ipswich, USA
TBE-Puffer (5x)	Eppendorf, Hamburg
TFB I	30 mM KAc 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin pH 5,8 (mit Essigsäure einstellen) steril filtrieren
TFB II:	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15 % Glycerin pH 7,0 (mit KOH einstellen) steril filtrieren

4.1.5 Medien

4.1.5.1 Zellkulturmedien

D-MEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Leibovitz Medium (L 15)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Opti-Mem [®] I Reduced Serum Medium	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe

4.1.5.2 Andere Medien

Carboxymethylcellulose Medium (CMC)	1,6 % CMC in L 15 (w/v)
IMMU-MOUNT	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA

LB-Flüssigmedium	10 g/L Bacto Trypton 5 g/L Bacto Hefeextrakt 10 g/L NaCl pH 7,5 (mit Natronlauge einstellen) autoklavieren ggf. Zugabe von Ampicillin auf 100 µg/mL
LB-Platten	LB-Medium + 15 g/L Select Agar; autoklavieren ggf. Zugabe von Ampicillin auf 100 µg/mL
SOC	Invitrogen, Karlsruhe

4.1.6 Oligonukleotide und Nukleinsäurestandards

4.1.6.1 Primer, Oligonukleotide und Sonden

Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Primer und Sonden.

Die Sonden sind am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (F*) und am 3'-Ende mit 5-Carboxytetramethylrhodamin (5-TAMRA, X) markiert.

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5'→3')	Schmelz-Temperatur	Hersteller
GFV-NS3	sense	Agg TCC AgT TgA TCg Cgg C	61,1 °C	Invitrogen, Karlsruhe
	antisense	gAg CgA CAg CCC CgA TTT CT	62,5 °C	Invitrogen, Karlsruhe
	Sonde (TMFV)	F*-Tgg TCA ACg TCC AgA CAA AAC CgA gCX TTg	71,9 °C	TIB MOLBIOL, Berlin
Tubulin-Gen (TUB)	sense	Tgg AAC CCA CAg TCA TTg ATg A	60,1 °C	Invitrogen, Karlsruhe
	antisense	TgA TCT CCT TgC CAA Tgg TgT A	60,1 °C	Invitrogen, Karlsruhe
	Sonde	F*-AgA TgC TgC CAA TAA CXT ATg CCC gAg g	69,9 °C	TIB MOLBIOL, Berlin
T7	antisense	TAA TAC gAC TCA CTA TAg gg	54,3 °C	Invitrogen, Karlsruhe
SP6	sense	ATT TAg gTg ACA CTA TAg	46,9 °C	Invitrogen, Karlsruhe
random Primer				Invitrogen, Karlsruhe

4.1.6.2 Nukleinsäurestandards

TrackIt™ 100 bp DNA Ladder

Invitrogen, Karlsruhe

TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder

Invitrogen, Karlsruhe

4.1.7 Plasmide

pYFVNS3amp

Promotion H.G. Bae [140]

4.1.8 Antikörper

Tabelle 4.2: Aufstellung der verwendeten Antikörper.

Antikörper	gekoppelter Fluorophor	Quelle
Primäre Antikörper		
α Beriglobin	-	Aventis Behring
α CD3	Alexa 405	DRFZ
α CD4	AmCyan	BD Pharmingen
α CD4	Pacific Orange	DRFZ
α CD4	PE	DRFZ
α CD4	PerCP	BD Pharmingen
α CD8	APC-Cy7	BD Pharmingen
α CD8	PerCP	BD Pharmingen
α CD11c	PE	Miltenyi Biotech
α CD14	Cy5	DRFZ
α CD14	PE	DRFZ
α CD14	PerCP	BD Pharmingen
α CD16	APC-Cy7	BD Pharmingen
α CD19	PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen
α CD19	PE	BD Pharmingen
α CD28	-	BD Pharmingen
α CD38	FITC	BD Pharmingen
α CD45	FITC	BD Pharmingen
α CD45	APC-Cy7	BD Pharmingen
α CD56	PE-Cy7	BD Pharmingen
α CD62L	APC	BD Pharmingen
α CD127 (IL-7R α)	PE	eBioscience
α CD154 (CD40L)	PE-Cy5	BD Pharmingen
α GFV MAK6330	-	RKI
α GFV MAK6538	-	RKI
α HLA-DR	FITC	BD Pharmingen
Isotype control	PE	BD Pharmingen
Sekundäre Antikörper		
α Maus-IgG (Ziege)	FITC	Caltag Laboratories
α Mensch-IgG/IgM (Ziege)	FITC	EUROIMMUN

4.1.9 Verwendete Kits

BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA
EndoFree Plasmid Maxi	Qiagen, Hilden
IIFT Flaviviren-Profil 2	EUROIMMUN AG, Lübeck
IIFT FSME-Viren	EUROIMMUN AG, Lübeck
IIFT Gelbfieber-Viren	EUROIMMUN AG, Lübeck
Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit	Invitek, Berlin
QIAamp [®] Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RayBio [®] Human Inflammation Antibody Array 3	RayBiotech, Inc., Norcross GA , USA
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System (Human)-hMGFP	Promega, Mannheim
SuperSignal [®] West Dura Extended Duration Substrat	Thermo Fisher Scientific, Bonn

4.1.10 Zelllinien, Bakterien- und Virusstämme

4.1.10.1 Zelllinien

Tabelle 4.3: Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen.

Bezeichnung	Ursprung	ATCC- Referenz	Kultur- medium	Temperatur und Begasung	Zusätze
Vero B4	Affennierenzellen	CCL-81	D-MEM	37 °C 5 % CO ₂	10 % FKS 1 % Pen/Strep 1 % L-Glutamin
Vero E6	Affennierenzellen	CRL-1586	D-MEM	37 °C 5 % CO ₂	10 % FKS 1 % Pen/Strep 1 % L-Glutamin
PS-Zellen	Schweine- nierenzellen	-	L 15	37 °C -	5 % FKS 1 % Pen/Strep 1 % L-Glutamin
HeLa	humane Epithelzellen (Cervixcarcinom)	CCL-2	D-MEM	37 °C 5 % CO ₂	10 % FKS 1 % L-Glutamin
Hek293T	humane embryonale Nierenzellen (Expression des SV40 großen T-Antigens)		D-MEM	37 °C 5 % CO ₂	5 % FKS 1 % L-Glutamin
Hek293 Graham	humane embryonale Nierenzellen	CRL-1573	D-MEM	37 °C 5 % CO ₂	5 % FKS 1 % L-Glutamin

Pen/Strep – Penicillin/Streptomycin-Antibiotika Mix; FKS – fötales Kälberserum, ATCC – „American Type Culture Collection“

4.1.10.2 Bakterienstämme

E. coli MC 1061

ATCC #53338

Genotyp: F- hsdR2 hsdM+ hsdS+ mcrA mcrB1 araD139 Δ (ara-leu)7696 Δ (lacIPOZY)X74 galE15 galU galK16 rpsL thi lambda-

Invitrogen Top10

Genotyp: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

4.1.10.3 Virusstämme

Gelbfieberevirus 17D

RKI-Impfstamm Charge
354/1

Gelbfieberevirus 17D

STAMARIL[®] Impfstoff,
Sanofi Pasteur MSD GmbH,
Leimen

Gelbfieberevirus Asibi

RKI-Stammsammlung
(Ghana, 1927)

FSME-Virus K23 [141]

RKI-Stammsammlung

4.1.11 Software

Adobe[®] Photoshop[®] CS3 Extended Version 10

Adobe Systems Inc.
München

FlowJo Software Version 8.6.-8.8.6.

Tree Star, Inc., Ashland,
OR USA

Lasergene 8:

- SeqMan Pro
- SeqBuilder

DNASTAR Inc., Madison,
USA

MS Office 2003

Microsoft Deutschland
GmbH, Unterschleißheim

MxPro 4.10 QPCR Software

Agilent Technologies, Inc.,
Santa Clara, CA, USA

Prism 5 für Windows

GraphPad Software,
La Jolla, CA, USA

RayBio[®] Analysis tool Version 3.1

RayBiotech, Inc., Norcross
GA , USA

SDS 1.9.1 (ABI Prism® Sequence Detector)

Applied Biosystems,
Carlsbad, Kalifornien, USA

siRNA Target Designer

Firma Promega [142]

SPSS 16.0 für Windows

SPSS Inc., Chicago, IL,
USA

4.2 Methoden

4.2.1 Mikrobiologische Methoden

4.2.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*-Bakterien

Für die Kultivierung von Bakterien wurden je nach Verwendungszweck entweder Flüssigmedium (LB-Medium) oder LB-Platten (LB-Medium plus 15 g/L Select Agar) eingesetzt. Zur Selektion von Bakterien mit Ampicillinresistenz wurde dem Kulturmedium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/mL zugegeben. Die Anzucht erfolgte jeweils über Nacht (üN) bei 37 °C im Bakterienschüttler (Flüssigmedium) oder im Brutschrank.

4.2.1.2 Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen

Um Bakterien langfristig zu konservieren wurden Dauerkulturen angelegt.

Dazu wurden 850 µL einer frischen üN-Kultur mit 150 µL sterilem Glycerin in Kryogefäßen gemischt und sofort bei -80 °C eingefroren.

4.2.1.3 Kleine Plasmidpräparation – Miniprep

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit der Fa. Invitex verwendet und nach den Angaben des Herstellers (Stand 07/2008) angewendet. Aus einer üN-Kultur wurden 0,5-2 mL für die Präparation verwendet.

Bis zur Verwendung wurde die Plasmidlösung bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

4.2.1.4 Große Plasmidpräparation – Maxiprep (endotoxinfrei)

Größere Mengen an Plasmiden wurden mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen gewonnen. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Stand 11/2005).

Die in 500 µL TE-Puffer aufgenommene Plasmid-DNA wurde UV-spektrometrisch analysiert (4.2.2.3) und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.1.5 Herstellung calciumchlorid-kompetenter Bakterien

Für die effektive Transformation (4.2.1.6) mussten zunächst kompetente Bakterien hergestellt werden, also ihre Empfänglichkeit für die Aufnahme von Fremd-DNA erhöht werden.

Eine 250 mL Kultur der Bakterien wurde bis zu einer OD₆₀₀ von eins (siehe 4.2.1.7) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und bei 6.000 x g für 5 min (4 °C)

pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 40 mL eiskaltem TFB I Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut pelletiert. Die Bakterien wurden in 8 mL TFB II Puffer aufgenommen, in vorgekühlten 1,5 mL Reaktionsgefäßen zu je 50 µL aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.1.6 Hitzeschocktransformation calciumchlorid-kompetenter Bakterien

Bei der Hitzeschocktransformation wird die Bakterienmembran durch kurzfristiges Erhitzen permeabilisiert, um Fremd-DNA in die Bakterien einzuschleusen. Die CaCl₂-kompetenten Bakterien (4.2.1.5) wurden auf Eis aufgetaut und auf das 10-fache Volumen mit kaltem CaCl₂ (0,1 M) aufgefüllt. 100 µL dieser Bakteriensuspension wurden zu der zu transformierenden DNA-Lösung gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock zur Aufnahme der DNA erfolgte bei 44 °C für 45 s in einem Thermoblock (Fa. Eppendorf), woraufhin die Ansätze sofort wieder auf Eis abgekühlt wurden. Nach Zugabe von 200 µL LB-Medium ohne Antibiotikum oder SOC-Medium wurden die Ansätze für etwa 30 min bei 37 °C vorinkubiert. 50-200 µL des Transformationsansatzes wurden auf vorgewärmte ampicillinhaltige Agar-Platten (100 µg/mL) ausgestrichen und üN im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

4.2.1.7 Messung der optischen Dichte einer Bakteriensuspension bei 600 nm

Zur Bestimmung der Bakteriendichte in einer LB-Flüssigkultur wurde die durch das Wachstum bedingte Trübung des Mediums bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Die Grundlage bildet das Lambert-Beersche Gesetz, welches die Extinktion als Funktion der Konzentration des Absorbens darstellt, wie in Formel 4.1 gezeigt. Dazu wurden 100 µL der Bakteriensuspension in einer Einwegküvette in einem Eppendorf Bio-Photometer vermessen.

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} * c * d$$

Formel 4.1: Lambert-Beersches Gesetz.

Die Extinktion E bei der Wellenlänge λ ist gleich dem Produkt aus dem Extinktionskoeffizienten ε bei der Wellenlänge λ , der Schichtdicke d und der Konzentration des Absorbens c.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Virus-RNA-Isolierung aus zellfreien Lösungen

Die Isolierung viraler RNA erfolgte durch das QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit der Fa. Qiagen nach Angaben des Herstellers (Stand 12/2005).

Die RNA wurde in 60 µL Elutionspuffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20 oder -80 °C gelagert.

4.2.2.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Zur Gewinnung der gesamten RNA aus Zellen wurde das RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben (Stand 10/1999) verwendet.

Die RNA wurde in 40 µL RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur Verwendung bei -20 oder -80 °C gelagert.

4.2.2.3 UV-Absorptionsmessung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung wurde die Probe je nach erwarteter Konzentration mit Wasser in einem Volumen von 50 µL verdünnt und UV-spektrometrisch bei 260 nm und 280 nm in einer UV-Einwegküvette gemessen. Dazu wurde ein Eppendorf Bio-Photometer verwendet. Die Konzentration der Probe ergibt sich nach folgenden Formeln:

$$c[\mu\text{g} / \text{mL}] = A_{260\text{nm}} * 50 \mu\text{g} / \text{mL} * \text{Verdünnung}$$

Formel 4.2: Berechnung der Konzentration einer wässrigen DNA-Lösung aus der Absorption bei 260 nm.

Diese Formel gilt für doppelsträngige DNA. A_{260} entspricht der gemessenen Absorption, der Faktor „Verdünnung“ berücksichtigt die Verdünnung vor der Messung. Für einzelsträngige DNA ist anstatt 50 µg/mL ein Faktor von 33 µg/mL einzusetzen.

$$c[\mu\text{g} / \text{mL}] = A_{260\text{nm}} * 40 \mu\text{g} / \text{mL} * \text{Verdünnung}$$

Formel 4.3: Berechnung der Konzentration einer wässrigen RNA-Lösung aus der Absorption bei 260 nm.

Diese Formel gilt für einzelsträngige RNA. A_{260} entspricht der gemessenen Absorption, der Faktor „Verdünnung“ berücksichtigt die Verdünnung vor der Messung.

Die Reinheit der Lösung in Bezug auf Proteinverunreinigungen wird über den Quotienten A_{260}/A_{280} ausgedrückt. Ein Wert von 1,7-2,0 [143] spiegelt dabei nahezu reine DNA wider. Für RNA liegt der Wert bei 1,9-2,1.

4.2.2.4 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen wurde zum Nachweis des erfolgreichen Einbaus eines Fragments in einen Vektor verwendet, sodass die Fragmente nicht weiter verwendet wurden. Aus diesem Grund konnte eine geringere Menge an Restriktionsenzym eingesetzt werden. Die Tabelle 4.4 stellt den analytischen Standardansatz dar.

Tabelle 4.4: Analytischer Restriktionsverdau.

Reagenz	Volumen [μL]
dest. Wasser	ad 10,0
Puffer (10 x; NEB)	1,0
ggf. BSA (100 x)	0,1
DNA (~ 0,2 μg)	x
Enzym (~2 U)	0,2

Die Ansätze wurden bei der für die eingesetzten Enzyme optimalen Temperatur inkubiert, wobei die Angaben des Herstellers (New England Biolabs[®]) befolgt wurden. Zur Analyse des Fragmentmusters wurde im Anschluss eine Gelelektrophorese (4.2.2.5) durchgeführt.

4.2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurde eine Gelelektrophorese bei einer Spannung von 80-100 V durchgeführt. Angesetzt wurden 0,8-1 %ige Agarosegele (w/v) in 1 x TBE-Puffer (Fa. Eppendorf), wobei für ein 50 mL-Gel 2,5 μL Ethidiumbromid ($c = 10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) zugegeben wurden. Vor dem Auftragen wurde jede Probe entsprechend dem Volumen mit 6 x DNA-Probenpuffer versehen.

Die Banden wurden in einem digitalen Geldokumentationsgerät der Fa. PEQLAB (Erlangen) analysiert.

4.2.2.6 Reverse Transkription

Um RNA für die gängigen molekularbiologischen Methoden einsetzbar zu machen, muss diese zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu nutzt man RNA-abhängige DNA-Polymerasen (reverse Transkriptase) die an zugegebene spezifisch oder unspezifisch bindende DNA-Primer ansetzen und entlang des RNA-Strangs einen komplementären DNA-Strang erzeugen.

4.2.2.6.1 Reverse Transkription für diagnostische Ansätze

Zur Herstellung von cDNA aus RNA in diagnostischen Ansätzen wurde die SuperScript[™] III reverse Transkriptase (Fa. Invitrogen) verwendet. Zunächst wurden 10 μL der RNA-Lösung für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA

aufzuschmelzen. Die RNA wurde anschließend sofort auf Eis gelagert und mit 10 µL des Reaktionsmixes (Tabelle 4.5) gemischt.

Tabelle 4.5: Ansatz der diagnostischen reversen Transkription.

Reagenz	Volumen [µL]
dest. Wasser	2,75
First Strand Buffer (5 x)	2,0
random Primer (3 µg/µL)	0,5
dNTP (10 mM)	1,25
DTT (0,1 M)	2,0
SuperScript™ III (200 U/µL)	0,5
RNase OUT (40 U/µL)	1

Die Transkription erfolgte bei 42 °C für eine Stunde. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase sowie zur Trennung der Hybridstränge wurde der Ansatz für 5 Minuten auf 93 °C erhitzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C oder -80 °C.

4.2.2.6.2 Reverse Transkription für experimentelle Ansätze

In nicht diagnostischen Fragestellungen wurde ein Ansatz zur Herstellung von cDNA auf Basis der „Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase“ (M-MLV RT) verwendet. Zunächst wurde der in Tabelle 4.6 aufgeführte Mastermix zusammengegeben.

Tabelle 4.6: Ansatz der reversen Transkription für experimentelle Ansätze.

Reagenz	Volumen [µL]
dest. Wasser	3,75
First Strand Buffer (5 x)	2,0
random Primer (0,1 µg/µL)	0,5
dNTP (10 mM)	1,25
DTT (0,1 M)	2,0
M-MLV RT (200 U/µL)	0,5

10 µL RNA-Lösung wurden für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Anschließend wurden 10 µL des Mastermixes zu der auf Eis abgekühlten RNA-Lösung gegeben. Der gesamte Ansatz wurde für 1 Stunde bei 42 °C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung 5 Minuten auf 93 °C erhitzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C oder -80 °C.

4.2.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)-basierte Techniken

Die PCR ist eine molekularbiologische Methode zur spezifischen Amplifikation bestimmter DNA-Bereiche. Der zu amplifizierende Bereich wird durch zwei sequenzspezifische DNA-Oligonukleotide (Primer) definiert, die die Zielsequenz einrahmen. Durch zyklische Wiederholung der Schritte: thermische Trennung der DNA-Doppelstränge, Bindung der Primer an die DNA-Einzelstränge und Vervollständigung der DNA-Doppelstränge durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase beginnend an den Primern wird die Zielsequenz exponentiell vermehrt.

4.2.2.7.1 Nachweis von Gelbfiebergemomäquivalenten mittels Zwei-Schritt TaqMan[®]-RT-PCR

In der Zwei-Schritt TaqMan[®]-RT-PCR wird die reverse Transkription von der Amplifikation der erzeugten cDNA getrennt. Der erste Schritt, die reverse Transkription, wurde wie unter 4.2.2.6 beschrieben durchgeführt. Die Quantifizierungs-PCR wurde nach den Angaben in Tabelle 4.7 auf einem Stratagene MX3000P oder MX3005P durchgeführt. Zum Nachweis der Genomäquivalente (GÄ) wurde eine etablierte PCR verwendet, die einen 105 bp langen Bereich innerhalb des NS3-Gens detektiert [60]. Zur absoluten Quantifizierung von Proben ist es notwendig, eine definierte Standardreihe (Herstellung siehe 4.2.2.7.2) mit bekannter Kopienzahl eines Referenzplasmides parallel zu messen und die Ergebnisse der unbekanntenen Proben darauf zu beziehen.

Tabelle 4.7: Ansatzvolumina und PCR-Programm für die GFV-Zwei-Schritt TaqMan[®]-RT-PCR.

Reagenz	Volumen [μ L]	Dauer	T [$^{\circ}$ C]	Zyklen
dest. Wasser	ad 50	3 min	94	45
10 x Puffer	5,0	30 s	94	
MgCl ₂ (50 mM)	4,0	1 min	60	
NS3 sense (10 μ M)	1,0			
NS3 antisense (10 μ M)	1,0			
dNTP (10 mM)	1,0			
TMFV-Sonde (10 μ M)	0,5			
ROX (50 x)	0,5			
Platinum [®] Taq (5 U/ μ L)	0,5			
cDNA	2,0 oder 5,0			

Die TaqMan[®]-PCR wurde auch eingesetzt, um die viralen Genomäquivalente im Serum zu bestimmen. Zur Umrechnung der im Ansatz nachgewiesenen Genomäquivalente in GÄ pro Milliliter Serum wurde ein Umrechnungsfaktor von 171 verwendet, der die

Verdünnungseffekte der vorgeschalteten Aufarbeitungsschritte berücksichtigt. Die Herleitung des Faktors ist in Tabelle 4.8 dargestellt.

Tabelle 4.8: Berechnung des Korrekturfaktors zur Umrechnung der GÄ/Ansatz in der TaqMan®-PCR in GÄ/mL Serum.

Ausgangsvolumen	Bearbeitungsschritt	Endvolumen	Korrekturfaktor
1000 µL Serum	für die Bestimmung der GÄ wurden 140 µL eingesetzt	140 µL Serum	7,14
140 µL Serum	vRNA-Extraktion	60 µL RNA	-
10 µL aus 60 µL RNA	cDNA-Synthese	20 µL cDNA	6
5 µL aus 20 µL cDNA	TaqMan®-PCR Bestimmung der GÄ pro Ansatz	50 µL TaqMan®-Ansatz	4
			≈ 171

4.2.2.7.2 Herstellung einer DNA-Standardverdünnungsreihe

Zur absoluten Quantifizierung der GFV-Genomäquivalente wurde eine Standardreihe des pYFVNS3amp-Plasmids [140] als serielle 1:10 Verdünnungsreihe zwischen 10^9 und 10^1 Plasmiden pro Ansatz hergestellt. Da jeweils ein Probenvolumen von 5 µL für die TaqMan®-RT-PCR vorgesehen war, wurde die erste Verdünnungsstufe mit einer Konzentration von $0,2 \cdot 10^9$ Kopien pro Mikroliter eingestellt. Ab der Verdünnungsstufe 10^6 Moleküle je Ansatz wurde 1 ng/µL λ-DNA zugegeben, um die unspezifische Bindung der Plasmide an die Plastikgefäße zu minimieren.

Das verwendete pYFVNS3amp-Plasmid enthält die Zielsequenz der Primer für die GFV-TaqMan®-RT-PCR, sodass es als Referenz für die Quantifizierung der PCR nutzbar ist [140]. Die Masse eines Plasmids, welches 4012 Nukleotide umfasst, wurde mittels Formel 4.4 berechnet. Jedes Molekül hat demnach eine Masse von $4,396 \cdot 10^{-9}$ ng.

$$\frac{\text{Nukleotide} * 660 \frac{g}{\text{mol} * \text{Nukleotid}}}{6,023 * 10^{23} \text{Moleküle} / \text{mol}} = \text{Molekülmasse} [g]$$

Formel 4.4: Berechnung der Molekülmasse aus der Nukleotidzahl.

660 g/mol*Nukleotid stellt die mittlere Masse eines Nukleotids in einem Mol doppelsträngiger DNA dar, für eine einzelsträngige RNA-Lösung ist analog ein Faktor von 340 einzusetzen. Voraussetzung ist, dass alle vorkommenden Nukleotide statistisch gleich häufig auftreten. $6,023 \cdot 10^{23}$ ist die Avogadrokonstante.

Aus der durch die Absorptionsmessung bestimmten Konzentration der DNA-Lösung (4.2.2.3) und der Molekülmasse ist gemäß Formel 4.5 die Anzahl der Plasmide pro Mikroliter Lösung zu bestimmen. Bezogen auf die Zielmenge von $0,2 \cdot 10^9$ Molekülen konnte mit Hilfe von Formel 4.6 die notwendige Verdünnung errechnet werden.

$$\frac{c[\text{ng} / \mu\text{L}]}{m[\text{ng} / \text{Molekül}]} = \text{Molekülzahl}[\text{Moleküle} / \mu\text{L}]$$

Formel 4.5: Bestimmung der Molekülzahl pro Mikroliter aus der Konzentration und der Molekülmasse.

c stellt die mittels UV-Absorptionsmessung ermittelte Konzentration der Nukleinsäure in Nanogramm pro Mikroliter dar. m bezeichnet die Molekülmasse.

$$\frac{c(\text{ist})}{c(\text{soll})} = \text{Verdünnungsfaktor}$$

Formel 4.6: Berechnung des Verdünnungsfaktors.

Der Verdünnungsfaktor berechnet sich als Quotient aus der ist-Konzentration und der soll-Konzentration.

Diese Ausgangslösung wurde anschließend seriell 1:10 bis zu einer Endkonzentration von $0,2 \cdot 10^1$ Moleküle/ μL verdünnt. Die hergestellte Standardreihe wurde anschließend in der TaqMan[®]-PCR getestet und eingesetzt.

4.2.2.7.3 Nachweis des Tubulin-Referenzgens

Zur Normierung der viralen Genomäquivalente auf die Zellzahl wurde die zelluläre mRNA für das Tubulin-Gen herangezogen, wie in der Veröffentlichung von Radonić *et al.* beschrieben [144]. Die aus den Zellen gewonnene Gesamt-RNA (4.2.2.2) wurde in cDNA umgeschrieben (4.2.2.6.2). Anschließend wurde die Tubulin-cDNA mittels der PCR nach Tabelle 4.9 quantifiziert. Die PCR lief auf einem Stratagene MX3000P oder MX3005P.

Tabelle 4.9: TaqMan[®]-RT-PCR zum Tubulin-mRNA-Nachweis.

Reagenz	Volumen [μL]	Dauer	T [$^{\circ}\text{C}$]	Zyklen
dest. Wasser	ad 25	10 min	95	45
10 x Puffer	2,5	20 s	95	
MgCl ₂ (50 mM)	2,25	30 s	68	
TUB sense Primer (10 μM)	0,5			
TUB antisense Primer (10 μM)	0,5			
dNTP (10 mM)	0,5			
TUB-Sonde (10 μM)	0,3			
ROX (50 x)	0,25			
Platinum [®] Taq (5 U/ μL)	0,1			
cDNA	2,0			

4.2.2.7.4 Sequenzierung

Zur Bestimmung einer Basensequenz wurde eine Sequenzierreaktion auf der Grundlage der Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger verwendet. Dazu wurden die Komponenten nach Tabelle 4.10 zusammengegeben und die Sequenzierreaktion durchgeführt. Die Reagenzien wurden aus dem BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Aufarbeitung der Proben sowie die Sequenzierung selbst wurde von der RKI internen Sequenzierabteilung auf einem 3130xl Genetic Analyzer durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit den *in silico* erzeugten Sequenzen mittels der Lasergene8 SeqMan Pro Software verglichen.

Tabelle 4.10: Zusammensetzung der Sequenzierreaktion sowie Sequenzierprogramm.

Reagenz	Volumen [μ L]	Dauer	T [$^{\circ}$ C]	Zyklen
dest. Wasser	ad 10,00	1 min	96	25
BigDye [®] Puffer (5x)	1,5	30 s	96	
Big Dye [®] Reaktionsmix	1	15 s	60	
SP6 oder T7 Primer (10 μ M)	0,50	4 min	60	
DNA	150-300 ng			

4.2.2.8 Herstellung von siRNA-Plasmiden

Zur Expression von spezifischen siRNAs in Zellen wurden Plasmide mit den entsprechenden Sequenzen erzeugt. Die siRNA-Plasmide wurden mit dem siSTRIKE[™] U6 Hairpin Cloning System (Human)-hMGFP der Firma Promega hergestellt. Dazu wurden die Zielsequenzen in Form von teilkomplementären DNA-Fragmenten in einen Vektor kloniert und somit unter die Kontrolle eines humanen U6-Promoters gestellt. Dieser Promoter wird durch die zelluläre RNA Polymerase II erkannt und führt zu einer konstitutiven Expression der „hairpin-RNA“, welche durch die zellulären Dicer in siRNA umgewandelt wird (siehe 2.2.1). Der Vektor exprimiert zusätzlich eine synthetische Variante des „Green Fluorescent Proteins“ unter der Kontrolle eines starken Cytomegalievirus-Promoters und ermöglicht somit eine einfache fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der Transfektionseffizienz.

4.2.2.8.1 Auswahl der Zielsequenzen

Die Zielsequenzen der siRNAs innerhalb des Gelbfiebergenoms wurden mit der siRNA Target Designer Software der Firma Promega ausgewählt [142].

Alle eingesetzten siRNAs entsprachen dem Typ Ia, für den die folgenden Hauptkriterien galten. Weitere berücksichtigte Kriterien sind auf der Internetseite des Herstellers einsehbar [142].

- das 5'-Ende des sense-Stranges ist ein G oder C
- das 5'-Ende des antisense-Stranges ist ein A oder U (T in der DNA-Sequenz)
- fünf der sieben letzten Basen des antisense-Stranges sind ein A oder U
- es existieren keine Sequenzen mit mehr als neun G's oder C's in Folge

Die vorgeschlagenen Sequenzen wurden auf Sequenzhomologien im Menschen und in der Maus untersucht und bei einem positiven Ergebnis verworfen. Die verbleibenden Sequenzen wurden auf eine potenzielle Wirkung in verschiedenen Gelbfieberstämmen geprüft. Die fünf vielversprechendsten Sequenzen wurden entsprechend der Vorgaben der Software in Form von Oligonukleotiden bestellt, die die Zielsequenz als „hairpin-Struktur“ sowie Insertionssequenzen für die Herstellung der siRNA-Plasmide (4.2.2.8.2) aufwiesen.

4.2.2.8.2 Herstellung von GFV-spezifischen siRNA-Plasmiden

Die Oligonukleotide (Invitrogen) wurden zunächst mit nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt und die Hybridisierung entsprechend Tabelle 4.11 durchgeführt.

Tabelle 4.11: Hybridisierung der Oligonukleotide.

Reagenz	Volumen [µL]	Dauer	T [°C]
Oligonukleotid A (1 µg/µL)	2	3 min	90
Oligonukleotid B (1 µg/µL)	2	15 min	37
Oligo Annealing Buffer	46		

Vor der Ligation mit dem linearisierten psiSTRIKE™ hMGFP Vektor wurden die hybridisierten Oligonukleotide 1:10 verdünnt, um eine Endkonzentration von 4 ng/µL je Oligonukleotid zu erhalten. Die Ligation wurde gemäß Tabelle 4.12 angesetzt und für 5 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 4.12: Ligationsansatz der psiSTRIKE™ hMGFP Vektoren.

Reagenz	Volumen [µL]
2x Rapid Ligation Buffer	5
psiSTRIKE™ hMGFP Vector (50 ng/µL)	1
vereinte Oligonukleotide (je 4 ng/µL)	1
nukleasefreies Water	2
T4 DNA-Ligase (3 U/µL)	0,5

Die ligierten psiSTRIKE™ Vektoren wurden, wie in Kapitel 4.2.1.6 beschrieben, in *E.coli* MC1061 Bakterien transformiert und darin amplifiziert. Die Plasmide der einzelnen Ansätze wurden gemäß Abschnitt 4.2.1.3 aus den Bakterien gewonnen und durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *Pst*I (4.2.2.4) auf erfolgte Insertion untersucht. Der

Vektor ohne Insert besaß eine Schnittstelle und ergab nach Restriktion den linearisierten Vektor mit einer Größe von 5.070 bp. Nach erfolgter Insertion der siRNA-Sequenz entstanden durch den Verdau zwei Banden mit 4.010 bzw. 1.113 bp Größe. Plasmide mit Insert wurden anschließend mit den Primern SP6 und T7 sequenziert (4.2.2.7.4), um Mutationen auszuschließen. Zur Transfektion eingesetzte psiSTRIKE™ Vektoren wurden unter endotoxinfreien Bedingungen in großem Maßstab, wie in Kapitel 4.2.1.4 beschrieben, hergestellt.

4.2.3 Virologische Methoden

4.2.3.1 Virustitration mittels Plaque-Test

Der Plaque-Test dient der Bestimmung der Anzahl an infektiösen Virus-Partikeln in einer Lösung wie z.B. Zellkulturüberstand oder Serum. Die zu untersuchende Lösung wird in verschiedenen Verdünnungsstufen auf infizierbare Zellen gegeben. Durch die Zugabe eines viskosen CMC-Mediums wird die Virusausbreitung jeweils auf die Nachbarzellen einer primär infizierten Zelle begrenzt, da die Brownsche Molekularbewegung unterbunden wird. Somit geht jede Plaque im Zellrasen auf ein infektiöses Partikel zurück. Durch Auszählung der entstanden Plaques lässt sich somit, unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe, die Anzahl der ursprünglich vorhandenen infektiösen Partikel berechnen.

4.2.3.1.1 Virustitration im 24-Loch Format

Die eingesetzten PS-Zellen wurden von den Zellkulturflaschen mittels Trypsin abgelöst, für 10 Minuten bei 1.100 x g zentrifugiert und auf eine Zellzahl von $6 \cdot 10^5$ Zellen/mL eingestellt. In jede Kavität der Lochplatte wurden 200 µL der Zelllösung gegeben. Von der Viruslösung wurden sechs Verdünnungsstufen seriell 1:10 hergestellt, wobei die Startverdünnung je nach erwarteter Viruskonzentration variiert wurde. Je 200 µL dieser sechs erzeugten Proben wurden jeweils in eine Reihe bzw. zwei Reihen (bei einer Doppelbestimmung), der 24-Lochplatte gegeben und anschließend geschwenkt. Die Ansätze wurden 4 h im Brutschrank ohne CO₂ Begasung inkubiert. Anschließend wurde in jede Kavität 400 µL L 15-CMC-Überschichtungsmedium gegeben, worauf sich eine 4-tägige Inkubation bei 37 °C ohne CO₂ anschloss. Nach dieser Zeit wurde das Medium entfernt, die Zellen 20 min in 3,7 % Formaldehyd fixiert und mindestens 30 min mit Naphthalin Schwarz gefärbt. Zur Bestimmung der infektiösen Partikel wurde ein Verfahren gewählt (siehe Formel 4.7), bei dem geringere Verdünnungsstufen mit größeren Plaquezahlen höher gewichtet werden als höhere Verdünnungen mit geringerer Plaquezahl [145]. Dies minimiert die statistische Anfälligkeit geringer Plaquezahlen je Kavität.

$$pfu / mL = \frac{\sum \text{Plaques}}{\sum V(\text{Viruslösungen})}$$

Formel 4.7: Berechnung der infektiösen Einheiten pro Milliliter.

Die Summe der Plaques in allen auswertbaren Verdünnungsstufen wird durch die Summe der Volumina an Viruslösungen dividiert. In diesen Volumina wurden die Verdünnungsstufen bereits in der Form berücksichtigt, dass z.B. das Virusvolumen der 1:10-Verdünnung nicht mit 200 µL sondern mit 20 µL angesetzt wurde.

4.2.3.1.2 Virustitration im 6-Loch Format

Um die häufig auftretenden Zellschäden in der 1:10 Verdünnung im 24-Loch Format zu vermeiden, wurde ein Ansatz gewählt, der ein größeres Probenvolumen ermöglicht und somit schädigende Faktoren stark verdünnt.

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 4.2.3.1.1 beschrieben, vorbereitet, auf eine Konzentration von $3,4 \cdot 10^5$ Zellen/mL eingestellt und jeweils 1.700 µL in 8 Kavitäten von 6-Lochplatten gegeben. Die zu untersuchende Viruslösung wurde 1:20 auf ein Endvolumen von 2.000 µL verdünnt und jeweils 250 µL davon in jede Kavität gegeben. Die Ansätze wurden 4 h im Brutschrank (37 °C, 95 % rel. Luftfeuchtigkeit, kein CO₂) inkubiert. Anschließend wurden jeder Kavität 1.950 µL L 15-CMC-Überschichtungsmedium zugegeben, worauf sich eine 4-tägige Inkubation im Brutschrank anschloss. Nach dieser Zeit wurde das Medium entfernt, die Zellen 20 min in 3,7 % Formaldehyd fixiert und mindestens 30 min mit Naphthalin Schwarz gefärbt. Die Berechnung der infektiösen Einheiten pro Milliliter Serum wurde gemäß der eingeführten Formel 4.7 durchgeführt.

4.2.3.2 Herstellung hochtitriger Viruslösungen

Für die Herstellung von großen Virusmengen wurden Vero B4-oder Vero E6-Zellen verwendet. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 90 % abgelöst und 10 Minuten bei 1.100 x g zentrifugiert. Ein Viertel der Zellen wurde in 40 mL D-MEM aufgenommen und mit der entsprechenden Viruslösung infiziert, wobei sich das Volumen nach der gewünschten Infektionsdosis zwischen 0,01 und 1,0 richtete. Nachdem die Lösungen vollständig durchmischt waren, wurden zwei Objektträger in Quadriperschalen mit je 5 mL Lösung beschichtet, der Rest wurde in eine Zellkulturflasche gegeben. Parallel dazu wurden zwei OT mit nicht infizierten Zellen eingesät.

Die ersten OT wurden nach vier Tagen fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung (siehe 4.2.3.3) unterzogen, um den Infektionsstatus der Zellen zu bestimmen. Abhängig von dem Ergebnis wurde die Infektion weitergeführt oder die Viren geerntet. Bei der Virusernte wurde der Zellkulturüberstand der infizierten Zellen, sowie der Negativkontrollüberstand in 50 mL Reaktionsgefäße überführt und 15 Minuten bei 4.000 x g zentrifugiert, um

Zellfragmente zu sedimentieren. Die Viruslösung wurde in geeigneten Gefäßen bei -80 °C eingefroren und parallel einer Virustitration (4.2.3.1.1) unterzogen.

4.2.3.3 Fluoreszenznachweis infizierter Zellen

Das folgende Protokoll wurde zum Nachweis einer erfolgreichen Infektion von Zellen mit dem *GFV* eingesetzt. Die monoklonalen Mausantikörper (MAK 6538 und MAK 6330) markieren virale E-Proteine auf der Zelloberfläche infizierter Zellen. Ein sekundärer AK (α Maus-IgG) ermöglicht über einen gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff die indirekte Detektion des viralen Proteins [146].

Die mit den infizierten Zellen bestückten Objektträger (siehe 4.2.3.2) wurden 10 min in Aceton fixiert. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger auf Auftragsschablonen gelegt. Diese Auftragsschablonen wurden zuvor mit je 25 μ L der primären Antikörper MAK 6538 und 6330 wie folgt bestückt:

Tabelle 4.13: Belegungsschema der Auftragsschablonen.

MAK 6538	1:100	1:500	1:1.000	-	PBS
MAK 6330	1:100	1:500	1:1.000	-	PBS

Die Positionen ohne primären Antikörper bzw. PBS dienen als Negativkontrollen für die Färbung. Die AK-Lösungen wurden für 1 h bei Raumtemperatur auf dem OT belassen. Darauf folgten drei fünfminütige Waschschrte der Objektträger mit PBS in Färbeküvetten. Nachdem der OT getrocknet war, wurde er wiederum auf die Auftragsschablone aufgelegt. Diesmal war jede Position mit 25 μ L einer 1:100 Verdünnung des sekundären Antikörpers (FITC-gekoppelter α Maus-IgG) bestückt, der wiederum 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln auf dem OT verblieb. Um überschüssigen, sekundären AK zu entfernen, wurde die Waschprozedur wiederholt. Nachdem der OT getrocknet war, wurden einige Tropfen Eindeckmedium (IMMU-MOUNT) und ein Deckgläschen auf den OT aufgebracht. Die so vorbereiteten Objektträger wurden entsprechend dem Fluoreszenzfarbstoff des sekundären Antikörpers unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 520 nm dokumentiert.

4.2.3.4 Infektion von Zellen

Im Rahmen der siRNA-Versuche wurden verschiedene Zelllinien (siehe Abschnitt 5.4.4 auf Seite 111) in 24-Lochplatten wie folgt mit Infektionsdosen von 0,01 bis 10 infiziert: Zunächst wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und 200 μ L der Viruslösung auf die Zellen gegeben. Nach 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C (in Abhängigkeit der Zelllinie mit 5 % oder ohne CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchtigkeit) wurde die Viruslösung wieder entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit jeweils 400 μ L PBS gewaschen und anschließend mit 400 μ L

Kulturmedium überschichtet und entsprechend der eingesetzten Zelllinie im Brutschrank inkubiert.

4.2.3.5 Virusisolierung aus Zellen

Um infektiöse Viren aus Zellen zu isolieren ist es erforderlich die Zellen zu zerstören, ohne dass die Viren im Zellinneren dabei ebenfalls zerstört oder inaktiviert werden.

Von den mit Virus infizierten Zellen wurde das Zellkulturmedium der 24-Lochplatten entfernt und die Zellen zweimal mit 400 µL PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µL PBS auf die Zellen gegeben, die mit einem Zellschaber vom Untergrund abgelöst und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt wurden.

Die Zellen wurden bei -80 °C für 10 Minuten eingefroren und anschließend bei 37 °C wieder aufgetaut. Diese Abfolge wurde insgesamt zweimal durchgeführt, um die Zellen aufzuschließen. Durch Zentrifugation bei 4.000 x g für 5 Minuten wurden nicht aufgeschlossene Zellen sowie Zellfragmente sedimentiert. Der Überstand wurde mittels Virustitration (4.2.3.1.1) untersucht.

4.2.4 Serologische Techniken

4.2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenztests (IIFT)

4.2.4.1.1 Gelbfiebertvirus-Immunfluoreszenztest

Zur Bestimmung der gelbfieberspezifischen IgM- bzw. IgG-Antikörper im Serum wurde der kommerziell erhältliche IIFT der Firma EUROIMMUN AG eingesetzt. Die Testdurchführung und Auswertung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Stand 01/2004).

4.2.4.1.2 Frühsommer-Meningoenzephalitisvirus-Immunfluoreszenztest

Für den Nachweis *FSMEV*-spezifischer IgM- und IgG-Antikörper wurde der kommerziell erhältliche IIFT der Firma EUROIMMUN AG eingesetzt. Die experimentelle Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Stand 01/2004).

4.2.4.1.3 Flaviviren-Profil 2-Immunfluoreszenztest

Der von der Firma EUROIMMUN AG vertriebene Test ermöglicht es, ein Serum gleichzeitig auf die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern gegen acht verschiedene *Flaviviren* zu untersuchen. Getestet wird auf Antikörper gegen das *FSME*-, *West-Nil*-, *Gelbfieber*-, *Japanische Enzephalitis-Virus* sowie gegen die *Dengue Viren 1-4*. Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers (Stand 01/2004) durchgeführt.

4.2.4.2 Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT)

Zur Bestimmung neutralisierender Antikörper im Serum wurden Verdünnungen des Testserums mit einer konstanten Menge an infektiösen Partikeln gemischt und nach Inkubation auf Zellen die Reduktion der gebildeten Plaques im Zellrasen in Abhängigkeit von der Serumverdünnung ausgewertet.

4.2.4.2.1 Nachweis neutralisierender *GFV*-Antikörper

Zum Nachweis neutralisierender, gelbfieberspezifischer Antikörper wurde das Testserum zunächst 1:5 und nachfolgend seriell 1:2 bis zu einer Endverdünnung von 1:160 mit L 15 Medium verdünnt.

50 µL der gefriergetrockneten Viruslösung aus der Referenzcharge 345/1 des *GFV* 17D-Impfstammes wurde 1:5.000 (200 PFU/mL) ebenfalls in L 15 Medium verdünnt. Zu jeweils 500 µL jeder Serumverdünnung wurden 500 µL Viruslösung gegeben, für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert.

Die eingesetzten PS-Zellen wurden auf eine Zellzahl von $6 \cdot 10^5$ Zellen/mL eingestellt (siehe 4.2.6.2) und jeweils 200 µL in jede Kavität einer 24-Lochplatte gegeben. Pro Kavität wurden 200 µL der Serum-Virus-Lösung zu den Zellen gegeben und durch Schwenken gemischt, wobei insgesamt eine 4-fach Bestimmung des Serums durchgeführt wurde. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank (37 °C, 95 % rel. Luftfeuchtigkeit ohne CO₂) wurden jeder Kavität 400 µL L 15-CMC-Überschichtungsmedium zugegeben. Nach 4 Tagen Inkubation im Brutschrank wurde der Überstand abgenommen und die Zellen für 20 Minuten mit 3,7 % Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine mindestens 30-minütige Inkubation mit Naphthalin Schwarz gefärbt. Die Plaques wurden ausgezählt und die 90 %ige Plaquereduktion nach Reed und Muench [147] berechnet.

4.2.4.2.2 Nachweis neutralisierender *FSMEV*-Antikörper

Für den Nachweis von neutralisierenden *FSMEV*-spezifischen Antikörpern wurden die eingesetzten PS-Zellen zunächst auf eine Zellzahl von $6 \cdot 10^5$ Zellen/mL eingestellt (siehe 4.2.6.2) und jeweils 300 µL in jede Kavität einer 24-Lochplatte gegeben. Die Zellen wurden 3-4 Stunden im Brutschrank (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, kein CO₂) inkubiert.

Das Testserum wurde zunächst 1:5 und nachfolgend seriell 1:2 bis zu einer Endverdünnung von 1:160 mit L 15 Medium verdünnt.

Zur Herstellung der PRNT-Viruslösung wurden Virusaliquots des FSME-Konsiliarlabors verwendet. Ein Aliquot mit $6,7 \cdot 10^6$ PFU/mL K603-*FSME-Virus* wurde schrittweise in L-15 Medium auf eine Endkonzentration von 170 PFU/mL verdünnt. Zu jeweils 300 µL jeder

Serumverdünnung wurden 300 µL Viruslösung gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Pro Kavität wurden 200 µL der Serum-Virus-Lösung zu den Zellen gegeben und durch Schwenken gemischt, wobei insgesamt eine zweifach Bestimmung des Serums durchgeführt wurde. Nach 30 Minuten Inkubation im Brutschrank (37 °C, 95 % rel. Luftfeuchtigkeit ohne CO₂) wurden jeder Kavität 500 µL L 15-CMC-Überschichtungsmedium zugegeben. Nach 4 Tagen Inkubation im Brutschrank wurde der Überstand abgenommen und die Zellen für 30 Minuten mit 3,7 % Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine mindestens 30-minütige Inkubation mit Naphthalin Schwarz gefärbt. Die Plaques wurden ausgezählt und die 90 %ige Plaquereduktion nach Reed und Muench [147] berechnet.

4.2.5 Immunologische Techniken

4.2.5.1 Zytokinbestimmung in Seren

Zur Bestimmung vorhandener Zytokine in humanen Seren wurde der membranbasierte semiquantitative RayBio® Human Inflammation Antibody Array 3 der Firma RayBiotech, Inc. eingesetzt, dessen grundsätzliche Funktionsweise in der nachfolgenden Abbildung 4.2 dargestellt ist.

Auf der Membran sind Antikörper gegen 40 verschiedene Zytokine in Doppelbestimmung fixiert (siehe Abbildung 4.1), die bei Inkubation mit einem Serum die entsprechenden Zytokine immobilisieren. Nach Entfernung des Serums wird die Membran mit einem Antikörpermix inkubiert, der wiederum alle zytokinspezifischen Antikörper enthält diesmal jedoch in löslicher, biotinylierter Form. Diese Detektionsantikörper binden ebenfalls hochspezifisch an die immobilisierten Zytokine und markieren diese zur Detektion. Nach Zugabe von HRP-gekoppeltem Streptavidin sowie eines Chemolumineszenzsubstrates (siehe 4.2.5.1.2) ist nur an Positionen mit gebundenem Zytokin eine Lichtreaktion messbar, die durch einen digitalen Chemolumineszenzreader detektiert wird. Eine Normalisierung der Messergebnisse, zum Vergleich von verschiedenen Membranen erfolgt über eine Positivkontrolle, die aus direkt auf der Membran fixiertem Biotin besteht.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS	POS	NEG	NEG	EOTAXIN	EOTAXIN-2	GCSF	GM-CSF	ICAM-1	IFN- γ	I-309	IL-1 α
2	POS	POS	NEG	NEG	EOTAXIN	EOTAXIN-2	GCSF	GM-CSF	ICAM-1	IFN- γ	I-309	IL-1 α
3	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
4	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
5	IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 β	MIP-1 δ
6	IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 β	MIP-1 δ
7	RANTES	TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	s TNF RI	s TNF RII	PDGF-BB	TIMP-2	BLANK	BLANK	NEG	POS
8	RANTES	TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	s TNF RI	s TNF RII	PDGF-BB	TIMP-2	BLANK	BLANK	NEG	POS

Abbildung 4.1: Beladungsschema des Human Inflammation Antibody Array 3 [Quelle: RayBiotech, Inc. [148]].

Dargestellt ist das Belegungsschema der verwendeten Zytokinmembranen. Die Detektionsantikörper sind für jedes Zytokin als Doppelbestimmung auf der Membran aufgebracht.

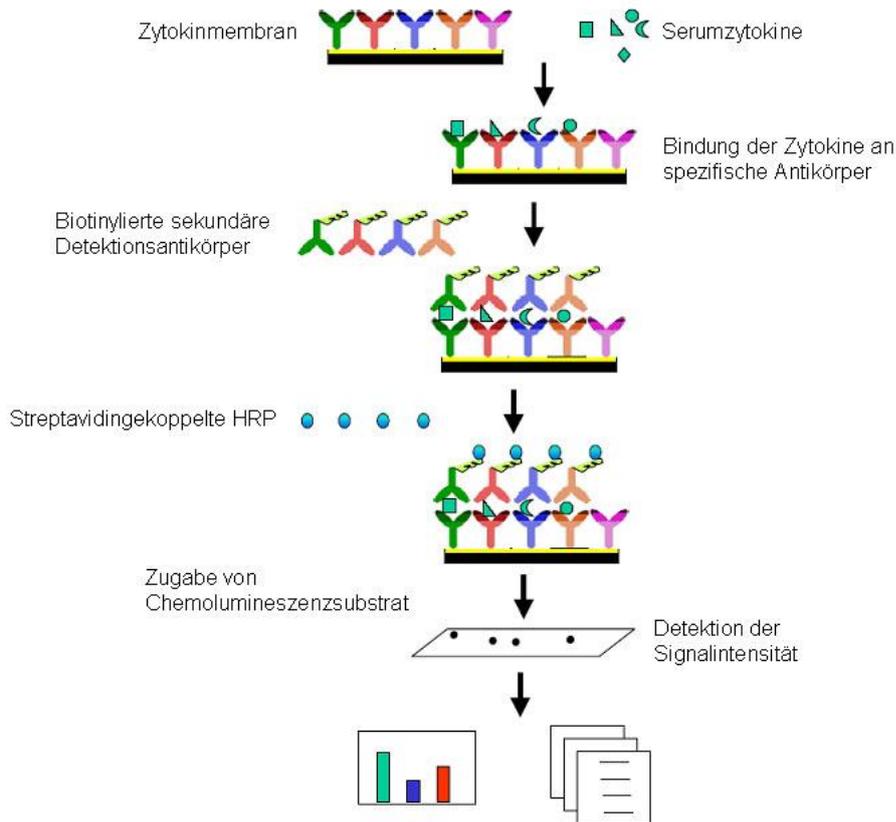


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Zytokinnachweises [Quelle: verändert nach RayBiotech, Inc. [148]].

Die Membranen sind mit spezifischen Antikörpern gegen die 40 nachzuweisenden Zytokine bestückt. Während der Inkubation mit dem zu untersuchenden Serum werden die vorhandenen Zytokine von diesen Antikörpern gebunden. Nach dem Entfernen des Serums wird die Membran mit biotinylierten, ebenfalls gegen die Zytokine gerichteten sekundären Antikörpern inkubiert. Nachdem nicht gebundene sekundäre Antikörper entfernt wurden wird Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) auf die Membran gegeben. Durch die starke Streptavidin-Biotin-Bindung werden die gebundenen sekundären AK mit HRP gekoppelt. Über die Zugabe von einem HRP-Substrat wird an den Bindungsstellen der sekundären Antikörper Chemolumineszenz erzeugt, die über ein Detektionsgerät quantifiziert und ausgewertet wird.

4.2.5.1.1 Inkubation der Zytokinmembranen

Die Inkubation der Membranen wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Stand 05/2007). Alle Inkubationsschritte erfolgten stets unter leichtem Schwenken.

4.2.5.1.2 Detektion der Chemolumineszenz

Abweichend von den Angaben des Herstellers wurde zur Detektion SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrat der Firma Pierce Biotechnology verwendet. Dazu wurden jeweils 250 µL Luminol/Enhancer Solution und 250 µL Stable Peroxide Solution gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur auf eine Membran gegeben. Um eine Austrocknung zu vermeiden, wurde die Membran zwischen zwei Plastikfolien gelegt, überschüssiges Substrat wurde entfernt und die Chemolumineszenzintensität an einem Chemi-Smart 3000 Gerät der Firma Vilber Lourmat gemessen.

4.2.5.1.3 Normalisierung und Auswertung

Die Normalisierung der einzelnen Membranen erfolgte über die bereits beschriebene Positivkontrolle, die aus direkt auf der Membran fixiertem Biotin besteht. Die Berechnungen wurden mit der Auswertungssoftware des Herstellers, RayBio® Analysis tool Version 3.1 (RayBiotech, Inc), durchgeführt. Nachdem alle Messwerte eines Probanden eingelesen waren, wurden die Chemolumineszenzsignale der einzelnen Membranen rechnerisch so verändert, dass die jeweiligen Positivkontrollen der Membranen den gleichen Wert besaßen. Durch diese Umformung der Messdaten wurde die direkte Vergleichbarkeit zwischen den Membranen hergestellt.

Zusätzlich zu den Darstellungen der Ergebnisse der Auswertungssoftware wurde sie dahingehend verändert, dass sie ebenfalls eine auf die Positivkontrolle bezogene prozentuale Expression der einzelnen Zytokine im Serum ausgibt. Diese prozentualen Werte wurden für die Analysen verwendet.

4.2.5.2 Analyse der zellulären Immunreaktion

Die Untersuchungsdaten zu den zellulären Immunreaktionen nach einer Gelbfieberimpfung wurden von Frau Nicole Bethke im Rahmen ihrer Promotion am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin (AG Andreas Thiel) gewonnen. Für den Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten wurden die Daten zur Verfügung gestellt.

Die unter Abschnitt 4.2.5.2 aufgeführten methodischen Beschreibungen wurden aus der Arbeit von Frau Bethke übernommen.

Die Daten wurden mittels der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) erhoben. Dazu wurden die Zellen durch fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper sowohl auf der Zelloberfläche als auch innerhalb der Zellen spezifisch markiert. Um eine unspezifische Bindung der monoklonalen Antikörper an Fc-Rezeptoren auf den Immunzellen zu verhindern, wurden alle Färbungen unter Anwesenheit von Beriglobin-Antikörpern (2 mg/mL) durchgeführt.

4.2.5.2.1 Absolute Zellzahlbestimmung aus Vollblut

Um die absolute Zellzahl der Immunzellen im Vollblut zu bestimmen, wurden TruCount-Reaktionsgefäße (Becton Dickinson GmbH) eingesetzt, welche eine festgelegte Anzahl von fluoreszenzmarkierten Partikeln enthielten.

Für die Analyse wurden 50 µL Heparin-Vollblut mit 20 µL eines gegen CD4, CD45, CD8, CD56 oder CD14 gerichteten, fluoreszenzmarkierten Antikörpers für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 450 µL der 1:10 in dest. Wasser verdünnten FACS Lysing Solution (Becton Dickinson GmbH) für 15 Minuten bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben, um diese gleichzeitig zu lysieren und zu fixieren. Die Zellen wurden dann durchflusszytometrisch analysiert und die absolute Zellzahl nach Formel 4.8 berechnet.

$$\frac{\text{Anzahl gemessene Zellen}}{\text{Anzahl gemessene Partikel}} \times \frac{\text{Gesamtanzahl Partikel}}{\text{Testvolumen}} = \text{Absolute Zellzahl pro mL}$$

Formel 4.8: Berechnung der absoluten Zellzahl durch das TruCount-System.

Die Anzahl der angefärbten Zellen einer FACS-Analyse werden durch die Anzahl der in der gleichen Analyse gemessenen fluoreszierenden Partikel dividiert. Dieser Quotient wird mit dem Quotienten aus der Gesamtzahl an fluoreszierenden Partikeln im Analyseröhrchen und dem Testvolumen (50 µL) multipliziert.

4.2.5.2.2 Immunfärbung lebender Zellen

Neben der absoluten Zellzahlbestimmung wurden einige Immunzellklassen mit einer Lebendzellaufnahme untersucht.

100 µL Vollblut wurden mit 2 mL Lysing Buffer (Becton Dickinson GmbH) nach den Angaben des Herstellers lysiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und das Zellpellet in 100 µL in PBS verdünnter Antikörperlösung aufgenommen und für 10 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS/BSA/EDTA-Puffer gewaschen und bei 300 x g 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µL PBS/BSA/EDTA-Puffer resuspendiert und sofort analysiert. Direkt vor der FACS-Messung wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in einer Endkonzentration von 400 nM zugegeben, um tote Zellen anzufärben und damit von der Messung ausschließen zu können. Die folgenden Antikörperkombinationen wurden für die einzelnen Zellklassen verwendet:

CD19⁺ B-Zellen: α CD19, α CD27

CD8⁺ T-Zellen: α CD8, α CD3, α CD38

NK Zellen: α CD3 Alexa 405, α CD56 PE-Cy7, α CD16 APC-Cy7

dendritische Zellen: DAPI, α CD45, α CD14, α CD56, α CD19, α CD11c, α HLA-DR

4.2.5.2.3 Antigen-Stimulierung im Vollblut

Durch die Stimulierung der Immunzellen mit Antigen werden spezifische Immunzellen aktiviert und lassen sich anhand von exprimierten Aktivierungsmarkern detektieren. Auf diese Weise ist es möglich, festzustellen, welchen Anteil an der Gesamtzahl einer Zellklasse die für dieses Antigen spezifischen Zellen ausmachen.

2 mL Vollblut wurden in 12 mL Rundboden-Gefäßen mit 1 μ g/mL α CD28-Antikörpern und 17D-Virus (10.000 PFU/mL) stimuliert. Als Negativkontrolle diente die Stimulierung nur mit 1 μ g/mL α CD28-Antikörper. Als Positivkontrolle wurde Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) in einer Konzentration von 1,5 μ g/mL in Verbindung mit 1 μ g/mL α CD28-Antikörpern eingesetzt. SEB bewirkt eine spezifische Quervernetzung von MHC Klasse II-Molekülen mit speziellen T-Zellrezeptoren ($V\beta$ -Familie) und bewirkt somit eine Aktivierung der T-Zellen.

Nachdem die Reagenzien gemischt waren, wurden die Röhrchen in einem 45° Winkel in den Inkubator bei 37 °C für insgesamt 6 Stunden gestellt. Nach 2 Stunden wurde Brefeldin A (10 μ g/mL) hinzugegeben, welches den Golgi-Apparat inhibiert und somit zu einer Proteinakkumulation im Endoplasmatischen Retikulum (ER) führt. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Röhrchen entnommen, nochmals gemischt und dann in 2x1 mL aufgeteilt, um nach identischer Stimulierung parallel zwei verschiedene Antikörperkombinationen messen zu können. Die Stimulierung wurde durch die Zugabe von 500 μ L kalter 20 mM Ethylendiamintetraessigsäurelösung (EDTA) in jeden Ansatz und einer Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten gestoppt. Um die Zellen zu waschen, wurden 5 mL kalter PBS/BSA-Puffer zugegeben und die Zellen bei 300 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert.

Für intrazelluläre Färbungen mussten die Zellen vor der Färbung zunächst fixiert und permeabilisiert werden. Die Fixierung geschah durch Resuspendierung des Pellets in 9 mL 1:10 in dest. Wasser verdünnter FACS Lysing Solution (Becton Dickinson GmbH) und Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren wurde das Zellpellet in 500 μ L 1:10 verdünnter FACS Permeabilizing Solution (Becton Dickinson GmbH) resuspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurden die Zellen gewaschen und pelletiert.

Für die Färbung der Zellen (intra- und extrazellulär) wurden die Pellets in 100 μ L PBS/BSA/EDTA-Puffer mit den entsprechenden Antikörpern aufgenommen und für

30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die nach der Stimulierung aufgeteilten Stimulierungsansätze wurden mit folgenden Antikörperkombinationen inkubiert:

Kombination I: α CD4 AmCyan, α CD4 Pacific orange, α CD14 PE, α CD40L PE-Cy5, α IFN- γ Pacific Blue, α TNF- α Alexa700, α IL-2 FITC and α IL-4 APC.

Kombination II: α CD4 AmCyan, α CD4 Pacific orange, α CD14 PE, α CD40L PE-Cy5, α IFN γ Pacific Blue, α TNF α Alexa700, α -IL-2 APC and α Ki-67 FITC.

Nach dem Färben wurden die Zellen mit PBS/BSA-Puffer gewaschen und bei 300 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 μ L PBS/BSA-Puffer aufgenommen und an einem LSRII-FACS (Becton Dickinson GmbH) analysiert. Die Auswertung der Daten wurde mit der FlowJo Software von TreeStar durchgeführt. Die Positionierung der Analysefenster wurde anhand der Negativ- und Positivkontrolle festgelegt.

4.2.6 Zellkultur

4.2.6.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Für Experimente mit eukaryotischen Zellen wurden diese in beschichteten Kulturflaschen passagiert. In Abschnitt 4.1.10.1 wurden die jeweiligen Kulturmedien und Zusätze für die verwendeten Zelllinien aufgeführt. Bei einer Konfluenz von 90-100 % wurde das Medium abgenommen, mit Diluent gewaschen und der Zellrasen mit Trypsin benetzt. Überschüssiges Trypsin wurde von den Zellen entfernt. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert, bis sie sich deutlich sichtbar vom Untergrund ablösten. Die abgelösten Zellen wurden in Medium aufgenommen, durch auf- und abpipettieren vereinzelt und in neue Kulturflaschen eingesät. Die Kultivierung erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und je nach Zelllinie mit oder ohne 5 % CO₂.

4.2.6.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10-20 μ L der in Lösung gebrachten Zellen (siehe 4.2.6.1) in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Ausgezählt wurden jeweils 4 x 16 Quadrate. Das arithmetische Mittel der 4 großen Quadrate ergab, unter Berücksichtigung ggf. durchgeführter Vorverdünnungen, mit dem Faktor 10⁴ multipliziert die Zellzahl pro Milliliter Ausgangslösung, wie in der Formel 4.9 dargestellt.

$$\text{Zellen pro mL} = \text{Vorverdünnung} \times \frac{\text{Zellzahl aller Quadrate}}{4} \times 10^4$$

Formel 4.9: Berechnung der Zellkonzentration aus dem Ergebnis der Zellzählung.

Zur Berechnung der Zellzahl pro Milliliter wird die Anzahl der Zellen, die in 4 x 16 Quadraten gezählt wurden, durch 4 dividiert und anschließend mit dem Vorverdünnungsfaktor multipliziert. Dieses Ergebnis ergibt mit 10^4 multipliziert die gesuchte Zellzahl pro Milliliter.

4.2.6.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Bei einer Konfluenz von nahezu 100 % wurden die abgelösten Zellen (siehe 4.2.6.1), 10 Minuten bei 1.100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, die Zellen in 90 % FKS und 10 % DMSO (v/v) aufgenommen und in Aliquots bei -80 °C eingefroren. Nach einigen Wochen wurden die Kryogefäße in einen Stickstoffprobenlagerungstank umgelagert.

Aufzutauende Zellen wurden unter heißem Wasser schnell auf Raumtemperatur gebracht, um die Zellschädigung durch Eiskristallbildung zu minimieren. Die Suspension wurde in 10 mL Kulturmedium gegeben und 10 min bei 1.100 x g zentrifugiert, um das zelltoxische Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen. Der Überstand wurde abgegossen, die Zellen in Medium aufgenommen und in Kulturflaschen umgesetzt.

4.2.6.4 Transfektion von Zellen

Die Transfektion von Zellen wurde zur Einbringung von siRNA-Plasmiden in eukaryotische Zellen verwendet, wobei zur Optimierung der Transfektionseffizienz verschiedene Transfektionsreagenzien getestet wurden. Grundsätzlich beruhen diese Verfahren darauf, dass sich Vesikel ausbilden, die die hinzugegebene DNA binden. Die DNA-Vesikel-Komplexe werden von den Zellen aufgenommen und die DNA wird zum Teil im Zellinneren freigegeben, sodass die genetische Information abgelesen werden kann.

Um die Adhäsion der Zellen an der Plastikoberfläche der Kulturplatten zu erhöhen, wurden diese vor dem Einsäen der Zellen zunächst mit poly-L-Lysin behandelt. Dazu wurden jeweils 100-200 µL poly-L-Lysinlösung (0,01 %) der Firma Sigma in jede Kavität der 24-Lochplatte gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das poly-L-Lysin entfernt und zur Wiederverwendung aufgehoben. Jede Kavität wurde mit 400 µL PBS gewaschen und anschließend für mindestens 20 Minuten getrocknet.

4.2.6.4.1 Transfektion mittels Lipofectamin™ 2000

Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) wurde mit kleinen Veränderungen wie vom Hersteller empfohlen eingesetzt (Stand 07/2006).

Die Konfluenz der eingesetzten Zellen (siehe Tabelle 5.23) lag zum Zeitpunkt der Transfektion bei etwa 50 %, wobei stets antibiotikafreies Medium zur Kultivierung verwendet wurde. Die Lösungen wurden entweder in zusatzfreiem Zellkulturmedium oder in Opti-Mem® I Reduced Serum Medium angesetzt, wobei die DNA-Menge im Bereich von 0,25-4 µg und die Lipofectamin-Menge von 0,5-6 µL variiert wurde.

Für einen Versuchsansatz im 24-Loch-Format wurde die DNA in 50 µL Transfektionsmedium in einem Polystyrol-Reaktionsgefäß aufgenommen und vorsichtig gemischt. Das Lipofectamin wurde ebenfalls in einem PS-Gefäß in 50 µL Transfektionsmedium aufgenommen, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Ausbildung der Komplexe wurden beide Lösungen zusammengegeben, kurz gevortext und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Kulturmedium der Zellen wurde abgenommen und die 100 µL Lipofectamin:DNA-Komplex wurden zu den Zellen gegeben. Um das Austrocknen der Zellen während der 4-6 Stunden dauernden Inkubation zu verhindern, wurden je Kavität weitere 100 µL des Transfektionsmedium hinzugegeben. Nach der Inkubation wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch 400 µL Zellkulturmedium ersetzt. Die Transfektionseffizienz wurde durch fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der GFP-Expression beurteilt, welches auf den Plasmiden codiert wurde.

4.2.6.4.2 Transfektion mittels FuGENE® HD Reagenz

Das FuGENE® HD Transfection Reagent der Firma Roche wurde nach den Angaben des Herstellers eingesetzt (Stand 11/2007).

Die Hek293T-Zellen wurden jeweils 24 Stunden vor der Transfektion so ausgesät, dass eine Konfluenz von etwa 80 % zum Zeitpunkt der Transfektion erreicht wurde. Die Transfektionsreagenzien wurden vor dem Zusammengeben auf Raumtemperatur angewärmt. Zur Minimierung störender Effekte wurden alle Lösungen in serumfreiem Zellkulturmedium ohne Zusätze von Antibiotika angesetzt.

Die Mischungsverhältnisse von FuGENE®-Reagenz (µL) zur DNA (µg) wurden in einem breiten Spektrum (siehe Tabelle 5.24) variiert, um die Effizienz zu optimieren. Für einen 24-Loch-Ansatz wurde die DNA in 100 µL Medium in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt und das entsprechende Volumen an Transfektionsreagenz dazugegeben. Anschließend wurde die Lösung gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die gebildeten FuGENE®:DNA-Komplexe wurden tropfenweise zu dem Kulturmedium der

Zellen gegeben und durch Schwenken gemischt. Die Transfektionseffizienz wurde durch fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der GFP-Expression beurteilt, welches auf den Plasmiden codiert wurde.

4.2.6.4.3 Transfektion mittels GeneJuice®

Die getesteten Hek293T-Zellen wurden in einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/mL mit je 500 μ L Lösung pro Kavität einer 24-Lochplatte eingesät. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank (37 °C, 95 % rel. Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) wurde die gewünschte Konfluenz von 80 % erreicht und die Zellen transfiziert. Die DNA-Menge wurde in einem Bereich von 0,5-1,5 μ g und die GeneJuice®-Menge von 0,75-3 μ L variiert (siehe Tabelle 5.25).

Pro Kavität einer 24-Lochplatte wurden 20 μ L Opti-Mem® Medium vorgelegt, die gewünschte Menge an GeneJuice® tropfenweise hinzugeben und gevortext. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA zugegeben und die Lösung durch pipettieren gemischt. Während einer weiteren Inkubation für 5-15 Minuten konnten sich die Komplexe ausbilden, anschließend wurde die Lösung tropfenweise zu den vorgelegten Zellen gegeben. Die Transfektionseffizienz wurde durch fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der GFP-Expression beurteilt.

4.2.7 Gelbfieber-Impfstudie

4.2.7.1 Studienziel

In Zusammenarbeit mit dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin (DRFZ) soll die Immunantwort gesunder Personen nach Verabreichung des GF-Impfstoffes 17D untersucht werden. Im Rahmen dieser Untersuchung soll die Virusvermehrung, die Entstehung der antikörperbasierten Immunität sowie die Expressionsmuster verschiedener Immunmodulatoren über einen Zeitraum von 4 Wochen analysiert werden. Des Weiteren soll die Frequenzen verschiedener T-, B-, NK- und DZ-Zellpopulationen sowie die Entstehung einer gelbfieberspezifischen T- und B-Zellantwort untersucht werden.

4.2.7.2 Aufbau der Studie

Insgesamt sollen 20 gesunde Personen (m/w) eine Erstimpfung mit dem Gelbfieberimpfstoff STAMARIL® (Sanofi Pasteur MSD GmbH) erhalten. Einmalig vor Impfung (Tag 0) und an den Tagen 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 und 28 sowie freiwillig an Tag 60 nach Impfung soll den Probanden jeweils 10 mL Heparin-Vollblut und 10 mL Blut zur Serumgewinnung peripher abgenommen werden.

Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Geschäftsstelle Charitéplatz 1, 10117 Berlin) geprüft und genehmigt.

4.2.7.3 Probandenauswahl

Die Probanden (m/w) wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- der/die Proband(in) war gesund und zählte nicht zu den Risikopatienten einer GF-Impfung
- die GF-Impfung erfolgte aus beruflichen oder privaten Gründen auf Wunsch des Probanden
- es handelte sich um eine Erstimmunisierung

Die Probanden wurden schriftlich und mündlich über den Ablauf der Studie und den wissenschaftlichen Hintergrund informiert. Zum Eintritt in die Studie lag die schriftliche Einverständniserklärung jedes Probanden vor.

4.2.7.4 Impfungen

Die Impfungen wurden mit dem kommerziell erhältlichen Gelbfieberimpfstoff STAMARIL[®] (Sanofi Pasteur MSD GmbH) durch einen zugelassenen Impfarzt an einer anerkannten Gelbfieberimpfstelle durchgeführt:

Dr. Kai Schumann

IAS Institut für Arbeits- und Sozialhygiene Stiftung

Robert-Koch-Platz 4-8, 10115 Berlin

4.2.7.5 Probengewinnung, -verarbeitung und -lagerung

Die peripheren Blutabnahmen wurden durch die Studienärztin durchgeführt:

Frau Nicole Bethke,

Klinische Immunologie

Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin

Charitéplatz 1, 10117 Berlin

Die Blutentnahmen wurden mit dem Vacutainer System der Firma Becton Dickinson GmbH durchgeführt.

Die eingesetzten Serum-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Vacutainer CAT 6 mL) waren mit speziellen Gerinnungsaktivatoren beschichtet, sodass die Gerinnung in wenigen Minuten abgeschlossen war. Die Röhrchen wurden mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur stehend gelagert, um die Blutgerinnung vollständig ablaufen zu lassen. Anschließend wurden sie bei 1.600 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Das Serum wurde steril mit Zellkulturpipetten abgenommen und in drei Kryogefäße aufgeteilt.

Das gewonnene Serum wurde bis zur Verwendung für folgende Methoden bei -80 °C gelagert:

- Nachweis der infektiösen *GFV*-Partikel (4.2.3.1.2)
- Nachweis der *GFV*-Genomäquivalente (4.2.2.7.1)
- Nachweis der *GFV*-spezifischen IgM- und IgG-Antikörper (4.2.4.1.1)
- Nachweis der *GFV*-spezifischen neutralisierenden Antikörper (4.2.4.2.1)
- Analyse der Expressionsmuster von 40 Zytokinen im Serum (4.2.5.1)

Zur Gewinnung von Vollblut wurden Röhren mit gerinnungshemmenden Eigenschaften (Becton Dickinson GmbH, Vacutainer Natriumheparin 170 I.U. 10 mL) eingesetzt. Das Blut wurde von Frau Nicole Bethke am gleichen Tag für folgende Untersuchungen verwendet:

- Auftreten der antigenspezifischen Immunzellen (4.2.5.2.3)
- Bestimmung der Frequenzen verschiedener Immunzellpopulationen (4.2.5.2.1 und 4.2.5.2.2)

4.2.8 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen für folgende Tests wurden mit der Software SPSS 16.0 der Firma SPSS Inc. durchgeführt:

- Wilcoxon-Analyse für abhängige Stichproben
- Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben
- T-Test für unabhängige, intervallskalierte Stichproben
- Levene-Test zur Überprüfung der Varianzgleichheit der Vergleichsgruppen im T-Test

Zur Identifizierung von Ausreißern wurde der Grubbs-Test angewandt, der für die Ermittlung von Ausreißern die Streuung aller Werte der Stichprobe berücksichtigt.

Im ersten Schritt wurde die Differenz (d_i) aus dem Prüfmerkmalergebnis (x_i) und Mittelwert der Stichprobe berechnet (Formel 4.10 I). Anschließend wurde die Prüfgröße (PG) errechnet. Sie entsprach dem Absolutwert des Quotienten aus maximaler Differenz und Standardabweichung der Stichprobe (Formel 4.10 II). Diese Prüfgröße wurde mit Vergleichsgrößen (VG) nach Grubbs für ein Signifikanzniveau von 95 % (siehe folgende Tabelle 4.14) verglichen. Ist PG größer-gleich VG so ist dieser Wert als Ausreißer nach Grubbs definiert.

$$I : d_i = x_i - \text{Mittelwert}$$

$$II : PG = \text{abs}\left(\frac{d_{\max}}{s}\right)$$

Formel 4.10: Formeln zur Berechnung des Grubbs-Tests.

Formel I stellt die Berechnung der Differenz d_i aus dem Prüfmerkmalergebnis x_i und dem Mittelwert dar. Formel II zeigt die Berechnung der Prüfgröße PG aus der maximalen Differenz innerhalb der Stichprobe und der Standardabweichung s .

Tabelle 4.14: Werte der Vergleichsgröße VG des Grubbs-Tests für ein Signifikanzniveau von 95 %.

Stichprobengröße (n)	VG für ein Signifikanzniveau von 95 %	Stichprobengröße (n)	VG für ein Signifikanzniveau von 95 %
3	1,153	12	2,285
4	1,463	13	2,331
5	1,672	14	2,371
6	1,822	15	2,409
7	1,938	16	2,443
8	2,032	17	2,475
9	2,110	18	2,504
10	2,176	19	2,532
11	2,234	20	2,557

5 Ergebnisse

5.1 Analyse von *GFV*-assoziierten Impfwischenfällen

5.1.1 Hintergrund der Impfkampagne

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat 2007 eine Initiative mit dem Ziel gestartet, die massive Verbreitung des *Gelbfiebervirus* zu bremsen und das zunehmende Risiko von urbanem Gelbfieber einzudämmen (siehe auch Abschnitt 2.1.1 auf Seite 5). Dazu sollen unter anderem in 12 afrikanischen Hochrisikoländern (Benin, Burkina Faso, Elfenbeinküste, Ghana, Guinea, Kamerun, Liberia, Mali, Nigeria, Senegal, Sierra Leone und Togo) [27] im Laufe von 10 Jahren schätzungsweise 48 Millionen Menschen geimpft werden. Ein Teilaspekt der Kampagne ist die flächendeckende Überwachung von impfbedingten Nebenwirkungen, um detailliertere Informationen zu deren Häufigkeit und Schwere zu gewinnen.

5.1.2 Impfkampagne in Togo 2007

Im August 2007 startete eine WHO-Impfkampagne für etwa 3,6 Millionen Menschen in Togo [89, 149].

Insgesamt wurden von 16 Patienten Proben aus dem Zeitraum der Akutinfektion sowie zusätzliche Rekonvaleszenzproben von fünf Patienten an das Robert Koch-Institut (RKI) gesandt (siehe folgende Tabelle 5.1 auf Seite 71). Die Altersspanne der Patienten reichte von 10 Monaten bis 77 Jahre (Median: 9 Jahre), neun Patienten waren männlich sieben weiblich.

Bei acht Patienten zeigte sich eine neurologische Symptomatik, zwei wiesen einen Ikterus auf. Die übermittelten Daten zweier Patienten wiesen sehr unspezifische Symptome (Fieber bzw. Kopfschmerzen) auf und bei vier Patienten manifestierten sich Auffälligkeiten der Haut.

Somit ergab sich für das Auftreten eines neurotrophen Verdachtsfalles (YEL-AND; neun Fälle) eine Wahrscheinlichkeit von 1:400.000 und für das Auftreten eines viscerotropen Verdachtsfalles (YEL-AVD; drei Fälle) von rund 1:1.200.000. Für den Verdacht eines schweren Impfwischenfalls mit Hautsymptomatik (vier Fälle) ergab sich eine Wahrscheinlichkeit von 1:900.000.

Unter den Akutseren konnten bei sieben Patienten gelbfieberspezifische IgM-Antikörper mit Titern zwischen 1:10 und 1:500 (Median: 1:100) nachgewiesen werden. Unter diesen sieben Proben war ein Patient mit neurologischen Symptomen (KA, Titer 1:10). Spezifische IgG-

Antikörper konnten in acht Akutproben im Bereich von 1:100 bis 1:500 (Median: 1:500) nachgewiesen werden.

Von fünf Patienten wurde zwischen dem 111. und 117. Tag nach Impfung erneut Serum gewonnen und auf neutralisierende Antikörper untersucht. Bei allen ließen sich diese Antikörper nachweisen, wobei die Titer zwischen 1:11 und 1:44 (Median: 1:22) lagen.

ERGEBNISSE

Tabelle 5.1: Grund- und Analysedaten der schweren Verdachtsfälle nach GF-Impfung aus Togo 2007.

ID	Alter [Jahren]	Geschlecht	Datum der Impfung	Beginn der Symptome [tni]	Leitsymptome	Erste Probenentnahme			Zweite Probenentnahme	
						Probenentnahme [tni/Datum]	IIFT		Probenentnahme [tni]	PRNT
							IgM	IgG		
KAA	9	m	15.09.07	4	Enzephalitis, Allergie	9	neg	neg	115	1:21
DA	5	m	14.09.07	2	Enzephalitis	13	neg	1:500	117	1:11
KD	5	m			Enzephalitis	20.09.07	neg	neg		
EK	9	w			Enzephalitis	22.09.07	neg	neg		
AE	77	w			Enzephalitis	26.09.07	neg	neg		
HA	1,5	m			Enzephalitis	27.09.07	neg	neg		
KA	54	m			Meningitis	20.09.07	1:10	1:100		
AG	25	w	20.09.07	0	periphere Gesichtslähmung	8	1:100	1:500	111	1:22
GF	14	m			Kopfschmerzen	24.09.07	neg	1:500		
AM	3,5	w			Ikterus, Fieber	24.09.07	1:500	neg		
AD	6	w	14.09.07	5	Ikterus, Fieber, Lebervergrößerung	10	1:100	1:500	116	1:22
BN	3	m			Fieber	22.09.07	1:100	neg		
CA	0,8	w			Ödeme an den Armen	25.09.07	neg	1:100		
MT	68	w			Ödeme an den Extremitäten	27.09.07	neg	neg		
NG	14	m			Ödeme an den Armen	27.09.07	1:100	1:500		
ED	23	m	19.09.07	1	Steven-Johnson Syndrom	9	1:10	1:500	111	1:44

tni – Tage nach Impfung, IIFT – indirekter Immunfluoreszenztest, PRNT – Neutralisationstest

5.1.3 Impfkampagne in Mali 2008

Im Jahr 2008 wurden in Mali 5,87 Millionen Menschen gegen Gelbfieber geimpft [89]. Von insgesamt sieben schweren Verdachtsfällen wurden Proben an das RKI gesandt (Tabelle 5.2). Sechs Proben stammen von männlichen Patienten, eine von einer weiblichen, wobei die Altersspanne zwischen 4 und 72 Jahren lag (Median: 18 Jahre).

Bei drei Patienten lag ein Ikterus mit einem Symptombeginn zwischen einem und fünf Tagen nach Impfung vor. Diese drei Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine akute Hepatitis B-Infektion auf. Zwei Patienten wurden wegen neurologischen Symptomen (Krämpfe bzw. Gesichtslähmung) behandelt, welche fünf bzw. zwölf Tage nach Impfung begannen. Ein 72 jähriger Patient (#062) fiel durch Tachykardie und Durchfall auf, die bereits 30 Minuten nach der Impfung auftraten. Die einzige weibliche Patientin wurde wegen einer hämorrhagischen Symptomatik behandelt.

Bezogen auf die Impfung von 5,87 Millionen Menschen ergab sich eine Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines neurotrophen Verdachtsfalles (zwei Fälle) von 1:2.935.000 und für einen viscerotropen Verdachtsfall (drei Fälle) rund 1:1.956.000. Nicht berücksichtigt wurde Patient #062, da sowohl die Symptome als auch das zeitliche Auftreten nicht zu den beiden Kategorien passten.

Die Proben wurden auf das Vorhandensein von *GFV*-Genomäquivalenten über die TaqMan[®]-PCR (4.2.2.7.1) sowie spezifischer Antikörper im IIFT und PRN-Test (4.2.4.1.1 und 4.2.4.2.1) untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 5.2 zusammengefasst. In keiner Serumprobe ließen sich Genomäquivalente des *GFV* nachweisen. Die beiden neurologischen Fälle wiesen weder Genomäquivalente noch Antikörper in der Rückenmarksflüssigkeit auf.

IgM-Antikörper gegen das *GFV* ließen sich in zwei Patienten nachweisen. Abgesehen von einer Probe konnten in allen Serumproben *GFV*-spezifische IgG-Antikörper mit Titern zwischen 1:100 und >1:1.000 nachgewiesen werden. Wegen massiver Pilz- und Bakterienkontaminationen der Proben war die Untersuchung auf neutralisierende Antikörper nur in vier der zehn Proben möglich. Die drei positiven Serumproben wiesen PRNT-Titer von 1:24 bzw. 1:11 auf, das untersuchte CSF war negativ.

Eine Virusanzucht für weitere Untersuchungen gelang aus den Proben nicht. Möglicherweise wurden die Viren während des Transportes durch zu hohe Temperaturen inaktiviert.

Die Expertenkommission zur Untersuchung der Impfwischenfälle in dieser Impfkampagne stufte letztendlich nur den Patienten mit der ID #063 als neurotrophen Impfwischenfall ein, alle anderen wurden auf Grund der gesamten Datenlage als nicht mit der Impfung in Verbindung stehende Erkrankungen identifiziert.

ERGEBNISSE

Tabelle 5.2: Daten der Impfwisfenfälle nach GF-Impfung aus Mali 2008.

ID	Alter [Jahre]	Geschlecht	Datum der Impfung	Beginn der Symptome [tni]	Leitsymptome	Probenentnahme [tni]	Akute HBV Infektion	GFV-PCR	GFV-IIFT		PRNT
									IgM	IgG	
002 [#]	19	m	14.04.08	5	Krämpfe	8	-	neg [§]	neg [§]	1:100 [§]	** [§]
063 [#]	4	m	15.04.08	12	Gesichtslähmung	15	neg	neg [§]	1:100 [§]	1:100 [§]	1:11 [§]
001 A1 [#]	10	m	14.04.08	1	Ikterus	7	pos	neg	neg	neg	**
001 B1 [#]						20	-	neg	1:320	1:320	1:24
064 [#]	7	m	14.04.08	5	Ikterus, Fieber, Schläfrigkeit	13	pos	neg	neg	>1:1.000	**
065 [#]	18	m	17.04.08	2	Ikterus	13	pos	neg	neg	1:1.000	**
019 [#]	33	w	15.04.08	5	Blutungen (Nase, Zahnfleisch, Verdauungstrakt)	9	-	neg	neg	1:320	**
062 [#]	72	m	18.04.08	30 min	Durchfall, Tachykardie	9	-	neg	neg	1:320	1:24

[#] negative Virusanzucht, [§] CSF negativ getestet, ** nicht auswertbar wegen Kontaminationen, tni – Tage nach Impfung, IIFT – indirekter Immunfluoreszenztest, PRNT – Neutralisationstest

5.1.4 Impfkampagne in Sierra Leone 2009

Im November 2009 wurden in den Ländern Benin, Liberia und Sierra Leone zusammen rund 13,2 Millionen Menschen geimpft, davon 3,98 Millionen in Sierra Leone [89]. Aus diesem Land wurden Proben von drei schweren Verdachtsfällen eingesandt, von denen zwei letal verlaufen sind (siehe Tabelle 5.3).

Die Proben wurden auf das Vorhandensein viraler Genomäquivalente (4.2.2.7.1) sowie *GFV*-spezifischer Antikörper (4.2.4.1.1) untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5.4 zusammengestellt. Bei allen drei Patienten handelte es sich um Frauen im Alter von 25, 28 bzw. 45 Jahren. Eine Patientin (KON) wurde mit abdominalen Beschwerden eingeliefert, zwei litten an neurologischen Symptomen. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines YEL-AVD-Verdachts betrug 1: 3,98 Millionen und eines YEL-AND rund 1:1,32 Millionen.

In keiner der eingeschickten Proben ließen sich mittels PCR Genomäquivalente detektieren. Ebenfalls wurden keine *GFV*-spezifischen IgM-Antikörper in den Proben gefunden. IgG-Antikörper gegen das *GFV* ließen sich in allen Serum- bzw. Plasmaproben mit Titern von 1:32 bis 1:3.200 (Median: 1:100) nachweisen. Besonders auffällig ist dabei der sehr hohe IgG-Titer der Patientin KEN, die bereits sechs Tage nach Impfung Werte von 1:3.200 im Serum und Plasma aufwies. Bei ihr konnten zusätzlich IgG-Antikörper im CSF mit einem Titer von 1:32 festgestellt werden.

Tabelle 5.3: Grunddaten der schweren Impfwischenfälle aus Sierra Leone 2009.

ID	Alter [Jahren]	Geschlecht	Datum der Impfung	Beginn der Symptome [tni]	Leitsymptome
KON	25	w	06.06.09	Hospitalisierung: 8	Fieber, abdominale Schmerzen, Exitus (10 tni)
MOY	28	w	02.06.09	5	Enzephalitis
KEN	45	w	02.06.09	2 Hospitalisierung 4	Enzephalitis, Fieber, vorübergehende Lähmung, Krämpfe, Bewusstseinsveränderung, Exitus (14 tni)

tni – Tage nach Impfung

Tabelle 5.4: Analysedaten der schweren Impfwischenfälle aus Sierra Leone 2009.

ID	Probenmaterial	Proben- entnahme [tni]	GFV-PCR	GFV-IIFT	
				IgM	IgG
KON	Plasma	8	neg	0	1:100
	Leber	10	neg	-	-
	Gehirn, Rückenmark	10	neg	-	-
MOY	Serum	10	neg	0	1:320
	Plasma	10	neg	0	1:100
	Urin	10	neg	-	-
	CSF	10	neg	0	0
	Rekonvaleszenzserum		neg	0	1:100
KEN	Serum	6	neg	0	1:3.200
	Plasma	6	neg	0	1:3.200
	CSF	6	neg	0	1:32
	Leber	14	neg	-	-
	Gehirn, Rückenmark	14	neg	-	-

tni – Tage nach Impfung, IIFT – indirekter Immunfluoreszenztest, PRNT – Neutralisationstest

5.2 Ergebnisse der Impfstudie

Die durchgeführte Impfstudie diente der Gewinnung eines umfassenden Überblicks über die immunologischen Abläufe nach einer erstmaligen Gelbfieberimpfung. Den Probanden wurde kommerziell erhältlicher STAMARIL® Impfstoff der Firma Sanofi Pasteur MSD GmbH verabreicht. Einmalig vor der Impfung (Tag 0) und an den Tagen 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 und 28 sowie freiwillig an Tag 60 wurde jeweils Blut zur Untersuchung abgenommen. Aus den gewonnenen Proben wurden die Virusreplikation, spezifische Antikörper, die Zytokinexpression sowie zelluläre Immunparameter erfasst. Die Untersuchungen zur zellulären Immunantwort wurden in Kooperation mit dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum im Rahmen der Promotion von Frau Nicole Bethke durchgeführt.

Die Bezeichnung „Proband“ wird im folgenden Text sowohl für weibliche als auch für männliche Studienteilnehmer verwendet.

5.2.1 Darstellung des Probandenkollektivs

Angelegt wurde die Studie für 20 Erstimpflinge. Ziel bei der Auswahl der Probanden war eine möglichst ausgewogene Verteilung in Bezug auf Alter und Geschlecht zu erreichen. In der folgenden Tabelle 5.5 ist eine Übersicht über das Studienkollektiv dargestellt. Aus dem Ursprungskollektiv, welches in die Studie eingetreten war, mussten im Verlauf zwei Probanden von der Analyse ausgeschlossen werden. Ein Proband (#04) hatte erst im Nachhinein bekanntgegeben, dass er bereits gegen Gelbfieber geimpft war und somit nicht

in die Studie passte. Der zweite Proband (#08) wies bereits vor der Immunisierung GFV-spezifische T-Zellen auf, die möglicherweise auf kreuzreaktive Zellen einer früheren Dengue-Infektion zurückzuführen sind.

Die verbleibenden 18 Probanden im Alter von 22 bis 53 Jahren (Median: 29) wurden in der Studie analysiert. Die geschlechtliche Gleichverteilung ließ sich nicht umsetzen, da nur fünf Probanden (28 %) männlich und 13 (72 %) weiblich waren. Insgesamt vier Probanden (22 %) wiesen zum Zeitpunkt der Gelbfieberimpfung eine bestehende Frühsommer-Meningoenzephalitis-Impfung (FSME-Impfung) auf. Die Zeitspanne zwischen FSME-Impfung und Studienbeginn betrug bei: #13 6 Jahre, #16 9 Jahre, #02 10 Jahre und #18 20 Jahre, wobei #18 nur eine Immunisierung erhalten hatte.

Tabelle 5.5: Untersuchungskollektiv der Impfstudie.

		Ursprungskollektiv	Analysekollektiv
Anzahl Probanden		20	18
Alter [Jahren]		22-53	22-53
	Median	30	29
Geschlecht	weiblich	15	13
	männlich	5	5
FSME-Vorimpfung	Anzahl	4	4

5.2.2 Verlauf der Virämie

Um die Virusvermehrung im Probanden beurteilen zu können, wurden im Serum sowohl die viralen Genomäquivalente (GÄ) mittels TaqMan[®]-PCR (4.2.2.7.1) als auch die vermehrungsfähigen Viren mittels Plaque-Test (4.2.3.1.2) bestimmt.

5.2.2.1 Nachweis viraler Genomäquivalente im Serum

Die TaqMan[®]-PCR (4.2.2.7.1) wurde zur Detektion von Virusgenomäquivalenten im Serum der Probanden eingesetzt. Zur Umrechnung der bestimmten Genomäquivalente pro PCR-Ansatz in GÄ pro Milliliter Serum wurde der Korrekturfaktor gemäß Tabelle 4.8 auf Seite 48 verwendet.

Acht der 18 Probanden (44 %) wurden PCR-positiv getestet. In Tabelle 5.6 werden die Ergebnisse mit den entsprechenden Genomäquivalenten pro Milliliter (GÄ/mL) Serum dargestellt. Die Zeitspanne in der eine Virämie gemessen werden konnte, erstreckt sich von Tag zwei bis Tag sieben, wobei an den Tagen fünf und sechs keine Proben entnommen wurden. Die gemessenen Konzentrationen lagen im Bereich von 252 bis 5233 GÄ/mL Serum. Zwei der acht PCR-positiven Probanden waren zuvor gegen FSME geimpft worden, #18 20 Jahre und #13 6 Jahre zuvor. In diesen beiden Probanden konnten die höchsten

Genomäquivalentkonzentrationen je Milliliter Serum (#18 5233 und #13 5167 GÄ/mL) nachgewiesen werden. Fünf der acht (63 %) PCR-positiven Probanden hatten eine nachweisbare Virämie an Tag vier.

Aus diesen gewonnenen Daten wurde das Analysekollektiv in die Gruppen PCR-positiv sowie PCR-negativ unterteilt. Die Gruppen wurden auf Unterschiede bezüglich der im Folgenden aufgeführten Parameter untersucht.

Tabelle 5.6: Ergebnisse der TaqMan®-PCR-Analyse zum Nachweis von GFV-Genomäquivalenten.

Die angegebenen Werte entsprechen GÄ/mL im Serum des jeweiligen Probanden an den angegebenen Abnahmetagen.

Proband	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 7
#09	343	neg	neg	neg
#19	neg	701	neg	neg
#20	neg	neg	252	neg
#11	neg	neg	2113	neg
#18*	neg	neg	5233	neg
#13*	neg	neg	5167	neg
#07	neg	neg	339	1803
#15	neg	neg	neg	420
#01, #02, #03, #05, #06, #10, #12, #14, #16, #17	neg	neg	neg	neg

* Probanden mit FSME- Immunisierung

5.2.2.2 Nachweis infektiöser Viruspartikel im Serum

Im Gegensatz zum Nachweis mittels PCR lassen sich mit dem Plaque-Test (4.2.3.1.2) ausschließlich replikationsfähige Viren nachweisen.

Bei keinem Probanden ließen sich an den Blutabnahmetagen infektiöse Viren im Serum nachweisen.

5.2.3 Verlauf der humoralen Immunantwort

5.2.3.1 Nachweis GFV-spezifischer Antikörper

Mit den eingesetzten Immunfluoreszenztests (4.2.4.1.1) wurden gelbfieberspezifische Antikörper der Klassen IgM und IgG aus dem Probandenserum nachgewiesen. Die folgende Abbildung 5.1 zeigt exemplarisch das Ergebnis des IgG Nachweises eines Probanden an den Tagen 0 und 28. Die Bilder A+B der Abbildung zeigen Zellen, die mit dem Referenzserum von Tag null inkubiert wurden. In Abbildungsteil A ist das Testfeld mit GFV-infizierten Zellen dargestellt, in B die Negativkontrolle mit nicht infizierten Zellen. Es zeigt sich in beiden Darstellungen nur eine sehr schwache unspezifische Hintergrundfärbung der Zellen. Die beiden Bilder C+D stellen die Ergebnisse des Serums von Tag 28 dar. Auf

der rechten Seite wiederum die Negativkontrolle (D), die die schwache Hintergrundfärbung zeigt. Im Abbildungsteil C sind die fluoreszenzmarkierten infizierten Zellen deutlich zu erkennen, die die gelbfieberspezifischen Antikörper im Probandenserum anzeigen.

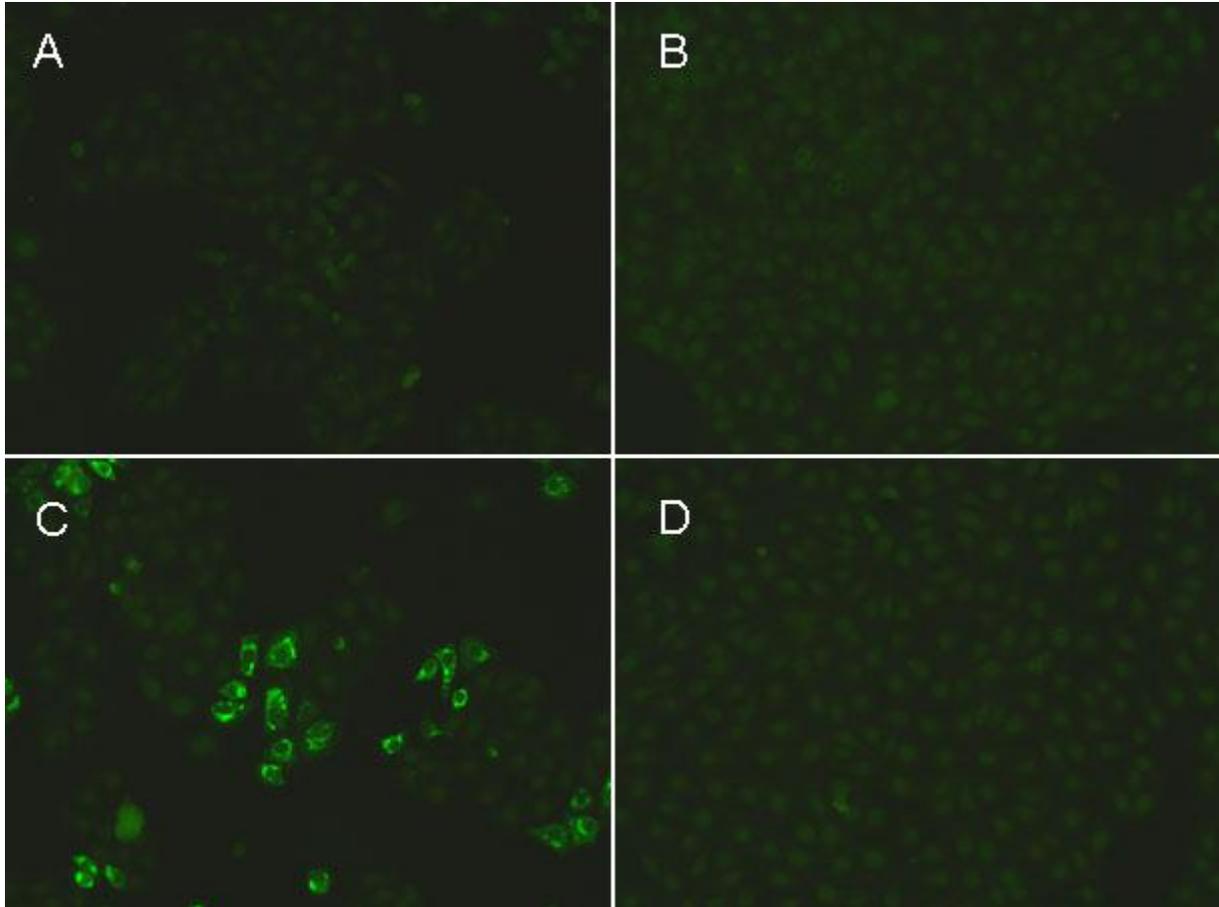


Abbildung 5.1: IgG-Immunfluoreszenztest der Untersuchungstage 0 und 28.

Dargestellt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der IIFTs des Probanden #18 an den Tagen 0 und 28. Die Bilder wurden mit einer 20-fachen Vergrößerung bei einer Wellenlänge von 520 nm aufgenommen. A: Serum Tag null/Analysefeld, B: Serum Tag null/Negativkontrollfeld, C: Serum Tag 28/Analysefeld, D: Serum Tag 28/Negativkontrollfeld.

In der nachfolgenden Tabelle 5.7 auf Seite 81 sind die Ergebnisse der Untersuchung auf IgM- (obere Zeile) und IgG-Antikörper (untere Zeile) für alle Probanden gezeigt. Dargestellt sind die Antikörpertiter jedes Probanden des Analysekollektivs im Zeitverlauf der Studie. Zusätzlich wurde für jeden Untersuchungstag der Median aller Probanden berechnet. Grau hinterlegt wurden hierbei diejenigen Tage an denen bei dem entsprechenden Probanden eine Virämie mittels PCR nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 5.6).

Grundsätzlich konnte bei allen Probanden an Tag 14 eine antikörperbasierte Immunantwort nachgewiesen werden. Für IgM-Antikörper lag der Bereich zwischen 1:32 und 1:320 (Median 1:100) und für IgG-Antikörper bei 1:10 bis 1:1.000 (Median 1:100).

Ein Proband (#16) wies bereits vor der Impfung einen IgM-Titer von 1:32 auf, der bis Tag zehn etwa konstant blieb und dann auf 1:100 anstieg. Er erhielt neun Jahre vor der Gelbfieberimpfung eine FSME-Immunsierung. Ebenfalls nach vorangegangener FSME-Immunsierung (sechs Jahre zuvor) wies der Proband #13 vor der GF-Immunsierung einen IgG-Titer von 1:32 auf, der bis zu Tag sieben anhielt und daraufhin auf bis zu 1:3.200 anstieg. Bei fünf Probanden (#02, #05, #13, #16 und #18) ließen sich bereits an Tag zehn IgG-Antikörper nachweisen, was 28 % der Probanden entsprach. Vier dieser fünf Probanden wurden vorher gegen FSME immunisiert.

Bei insgesamt 14 Probanden (78 %) ließen sich beide Antikörperklassen am selben Untersuchungstag erstmalig nachweisen, davon 13 an Tag 14 und einer an Tag 10.

In drei Fällen ließen sich IgG-Antikörper vor IgM-AK nachweisen (#02, #13 und #18) in nur einem Fall IgM vor IgG (#16). Bei diesen vier Fällen handelt es sich um die vier FSME-Vorgeimpften.

Einen statistisch signifikanten Einfluss der Nachweisbarkeit der GÄ auf die Titerhöhe im IIFT ließ sich nicht nachweisen. Ebenso konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede gezeigt werden.

Zwei Probanden (#12 und #20) wurden in Tabelle 5.7 gesondert aufgeführt, da sie eine stark abweichende Zytokinexpression aufwiesen und daher zusätzlich separat analysiert wurden (siehe 5.2.5). In Bezug auf die IIFT-Ergebnisse zeigten sie jedoch keine Auffälligkeiten.

ERGEBNISSE

Tabelle 5.7: Ergebnisse der IgM- und IgG-Immunoﬂuoreszenztests.

Für jeden Probanden sind die IgM- (obere Zeile) und IgG-Antikörpertiter (untere Zeile) dargestellt. Grau hinterlegte Felder markieren diejenigen Tage an denen bei den Probanden eine Virämie durch die PCR nachgewiesen werden konnte (vergl. Tabelle 5.6). Abgetrennt wurden zwei Probanden, die eine besonders massive Zytokinreaktion gezeigt haben (#12, #20), sowie alle Probanden, die eine FSME-Impfung vor der Studie erhalten hatten. Zusätzlich ist für jede Antikörperklasse der Median über alle Probanden für jeden Studientag angegeben.

Proband	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 28	Tag 60
#05	0	0	0	0	0	0	1:100	1:100	1:100	-
	0	0	0	0	0	0	1:10	1:32	1:320	-
#15	0	0	0	0	0	0	0	1:320	1:320	1:320
	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:320	1:320
#17	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:320	1:100
	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:1.000	1:1.000
#09	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:100	1:100
	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:320	1:1.000
#10	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:320	1:100
	0	0	0	0	0	0	0	1:10	1:100	1:1000
#03	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:100	1:100
	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:320	1:1.000
#11	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:320	1:100
	0	0	0	0	0	0	0	1:10	1:320	1:320
#19	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:320	-
	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:100	-
#01	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:100	1:100
	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:100	1:100
#14	0	0	0	0	0	0	0	1:32	1:320	-
	0	0	0	0	0	0	0	1:32	1:100	-
#07	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:100	-
	0	0	0	0	0	0	0	1:10	1:320	-
#06	0	0	0	0	0	0	0	1:32	1:100	-
	0	0	0	0	0	0	0	1:32	1:320	-
#20	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:320	-
	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:100	-
#12	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:320	1:100
	0	0	0	0	0	0	0	1:32	1:320	1:320
#16*	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:10	1:10	1:100	1:100	1:100
	0	0	0	0	0	0	1:32	1:320	1:1.000	1:1.000
#13*	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:100	1:32
	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:100	1:1.000	1:3.200	1:3.200
#18*	0	0	0	0	0	0	0	1:32	1:100	1:100
	0	0	0	0	0	0	1:32	1:320	1:1.000	1:1.000
#02*	0	0	0	0	0	0	0	1:32	1:100	1:32
	0	0	0	0	0	0	1:10	1:100	1:320	1:320
Median IgM	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:100	1:100
Median IgG	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:320	1:1.000

* Probanden mit FSME- Immunisierung

Zur Abklärung ob sich die vorherige FSME-Impfung auf die Bestimmung der Antikörpertiter im GFV-IIFT auswirkt, wurden die Nullseren der vier Probanden einem Flaviviren-Profil 2-Immunfluoreszenztest unterzogen, der Antikörper gegen acht verschiedene *Flaviviren* nachweist. Tabelle 5.8 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung. Das Nullserum des Probanden #13 enthielt kreuzreaktive IgG-Antikörper, die einem Titer von 1:32 gegen das *FSME-Virus* und 1:10 gegen das *Gelbfieber-, West-Nil-, Dengue 1-* sowie *Dengue 2-Virus* entsprechen. Im Nullserum des Probanden #16 ließen sich anti-GFV-IgM-Antikörper mit einem Titer von 1:10 sowie ein IgG-Titer von 1:10 gegen das *FSME-Virus* nachweisen. Das Serum des Probanden #18 enthielt keine *Flavivirus*-spezifischen Antikörper. In dem Nullserum des Probanden #02 konnten IgM-Antikörper gegen das *West-Nil-Virus* mit einem Titer von 1:10 detektiert werden.

Tabelle 5.8: Ergebnis des Flaviviren-Profil 2-IIFT der Nullseren der Probanden #02, #13, #16 und #18.
 Dargestellt sind die bestimmten Titer der Nullseren gegen die einzelnen Viren der *Flavivirus*-Familie. *FSMEV* = *Frühsommer-Meningoenzephalitisvirus*, *GFV* = *Gelbfiebervirus*, *WNV* = *West-Nil-Virus*, *JEV* = *Japanische Enzephalitisvirus*, *DENV1-4* = *Dengue Virus 1-4*.

Proband	AK-Klasse	Titer gegen das...							
		<i>FSMEV</i>	<i>GFV</i>	<i>WNV</i>	<i>JEV</i>	<i>DENV1</i>	<i>DENV2</i>	<i>DENV3</i>	<i>DENV4</i>
#02	IgM	0	0	1:10	0	0	0	0	0
	IgG	0	0	0	0	0	0	0	0
#13	IgM	0	0	0	0	0	0	0	0
	IgG	1:32	1:10	1:10	0	1:10	1:10	0	0
#16	IgM	0	1:10	0	0	0	0	0	0
	IgG	1:10	0	0	0	0	0	0	0
#18	IgM	0	0	0	0	0	0	0	0
	IgG	0	0	0	0	0	0	0	0

5.2.3.2 Bestimmung der neutralisierenden Antikörper gegen das *GFV*

Im Gegensatz zum Antikörpernachweis mittels des Immunfluoreszenztests, der eine Unterscheidung von IgM- und IgG-Antikörpern zulässt, wird mit dem Neutralisationstest (4.2.4.2.1) eine bestimmte Funktion der Antikörper unabhängig von der Klasse detektiert. Es werden nur Antikörper nachgewiesen, die die Fähigkeit besitzen durch Bindung an das Virus eine Infektion von Zellen zu verhindern. Die gemessenen Plaque-Reduktions-Neutralisationstest-Titer (PRNT-Titer) stellen somit die Schutzwirkung des Serums vor einer Infektion dar. Ein Titer von 1:10 wird dabei als ausreichender Schutz vor einer Infektion angesehen [150].

In der folgenden Abbildung 5.2 sind die Neutralisationstests des Probanden #18 mit Serum von Tag 0 und 28 gezeigt. Von links nach rechts wurde das Serum jeweils 1:2 verdünnt eingesetzt, wobei die jeweilige Verdünnungsstufe in der Abbildung angegeben ist. In

Abbildungsteil A wurde das Referenzserum vor der Impfung eingesetzt. In der 1:10 Verdünnung sind Zellschädigungen durch die höhere Serumkonzentration zu erkennen. In der 1:20 Verdünnung ist eine leichte Reduktion der Plaquezahl sichtbar, ab der 1:40 Verdünnung blieb die Plaquezahl konstant. Im Abbildungsteil B ist der Neutralisationstest für das Serum an Tag 28 gezeigt. In der höchsten Serumkonzentration sind wiederum Zellschäden zu erkennen. Deutlich sichtbar im Vergleich zu Test A, ist die drastische Reduktion der Plaques bis in hohe Serumverdünnung hinein. Die Berechnung der 90 %igen Reduktion des Virus ergab für dieses Beispiel einen PRNT-Titer von 1:55.

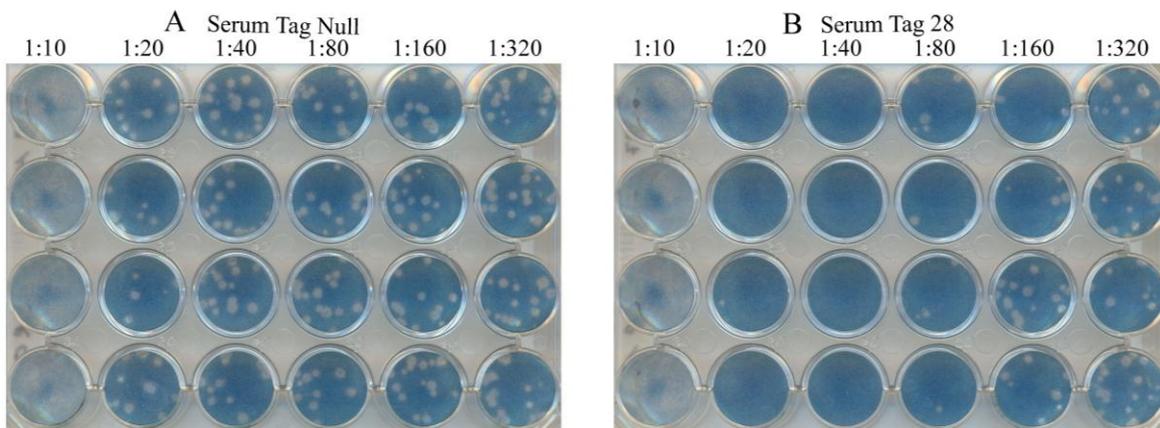


Abbildung 5.2: Neutralisationstests des Probanden #18 an den Tagen 0 und 28.

Dargestellt sind die beiden Neutralisationstests des Probanden #18 für die Tage 0 (Abbildungsteil A) und 28 (Abbildungsteil B). Von links nach rechts wurden die Serumverdünnungen von 1:10 bis 1:320 entsprechend 4.2.4.2.1 mit einer konstanten Menge an Virus gemischt und aufgetragen.

Untersucht wurden jeweils die Nullseren als Referenz sowie die Proben ab Tag sieben. In der Tabelle 5.9 werden die Einzelwerte jedes Probanden dargestellt.

Es zeigt sich, dass die Probanden #01 und #16 (11 %) bereits an Tag sieben einen PRNT-Titer von 1:11 aufwiesen. 14 Probanden (78 %) entwickelten zwischen Tag sieben und zehn einen detektierbaren Titer. Bei #10 und #19 entwickelten sich die Antikörper zwischen Tag 10 und 14. Der Vergleich der Medianwerte zeigt, dass zwischen Tag 14 (1:57) und Tag 28 (1:58) kaum Veränderungen im Titer stattfanden.

Da an Tag 14 alle Probanden einen Titer aufwiesen, dessen Median sich in der Folge nicht mehr verändert, wurden diese Daten verwendet, um das Analysekollektiv in die beiden Gruppen PRNT-hoch mit Titern >1:58 (#02, #06, #07, #10, #12, #13, #16, #17 und #20) sowie PRNT-niedrig mit Titern <1:58 (#01, #03, #05, #09, #11, #14, #15, #18 und #19) zu unterteilen. Die Gruppierung dient der Untersuchung weiterer Immunparameter im Hinblick auf die Höhe der sich ausbildenden neutralisierenden Antikörpertiter.

Nur ein Proband (#16) der vier FSME-Preimmunisierten wies ein früheres Auftreten der neutralisierenden Antikörper auf. Drei dieser Probanden (#02, #13 und #16) wiesen jedoch an Tag 28 verhältnismäßig hohe Titer auf.

Die beiden Probanden mit abweichenden Zytokinmustern zeigten keine eindeutige Tendenz. Einer (#12) wies mit Titern um 1:80 recht hohe Werte auf, der andere (#20) lag mit 1:54 bis 1:63 im Bereich des Medians.

Die Nachweisbarkeit der Virämie sowie das Geschlecht der Probanden hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Titerhöhe an den Untersuchungstagen.

Tabelle 5.9: Ergebnisse der GFV-Antikörperneutralisationstests.

Angegeben sind die gemessenen Neutralisationstiter jedes Probanden, sowie der Median und Mittelwert des Kollektivs für jeden Untersuchungstag. Abgetrennt wurden zwei Probanden, die eine besonders massive Zytokinreaktion gezeigt haben (#12, #20), sowie alle Probanden, die eine FSME-Impfung vor der Studie erhalten hatten.

Proband	Tag 0	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 28	Tag 60
#01	0	1:11	1:37	1:47	1:49	1:45
#17	0	0	1:39	1:87	1:81	1:54
#06	0	0	1:17	1:82	1:97	-
#07	0	0	1:41	1:81	1:73	-
#03	0	0	1:33	1:53	1:51	1:43
#14	0	0	1:26	1:51	1:59	-
#15	0	0	1:22	1:47	1:80	1:81
#11	0	0	1:21	1:43	1:42	1:42
#05	0	0	1:19	1:40	1:45	-
#09	0	0	1:23	1:37	1:42	-
#10	0	0	0	1:73	1:52	1:43
#19	0	0	0	1:48	1:56	-
#12	0	0	1:50	1:82	1:82	1:80
#20	0	0	1:44	1:63	1:54	-
#16*	0	1:11	1:49	1:80	1:102	1:91
#02*	0	0	1:25	1:64	1:88	1:95
#13*	0	0	1:34	1:59	1:70	-
#18*	0	0	1:42	1:55	1:56	-
Median	0	0	1:30	1:57	1:58	1:65
Mittelwert	0	1:1	1:29	1:61	1:66	1:65

* Probanden mit FSME- Immunisierung

5.2.3.3 Bestimmung der neutralisierenden Antikörper gegen das *FSME-Virus*

Bei den Probanden, die eine FSME-Impfung vor der Impfstudie erhalten hatten, wurden die *FSME-Virus*-spezifischen neutralisierenden Antikörper nach 4.2.4.2.2 bestimmt. In der Tabelle 5.10 sind die *FSME-Virus*-Antikörpertiter an den Tagen 0 und 14 dieser Probanden dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass bei den Probanden #02 und #18 weder vor noch

nach der Impfung neutralisierende *FSME-Virus*-Antikörper nachweisbar waren. Der Proband #13 wies vor der Impfung einen Titer von 1:93 und 14 Tage später einen Titer von 1:47 auf. Der Proband #16 wies vor der Impfung keinen Titer, an Tag 14 einen Titer von 1:13 auf.

Tabelle 5.10: Ergebnisse des FSMEV-Antikörperneutralisationstests.
 Angegeben sind die gemessenen Titer an neutralisierenden Antikörpern der Probanden mit vorheriger FSME-Impfung.

Proband	Tag 0	Tag 14
#02	0	0
#13	1:93	1:47
#16	0	1:13
#18	0	0

5.2.3.4 Untersuchung der Zytokinexpression im Serum der Probanden

Die Untersuchung der im Serum vorhandenen Zytokine wurde gezielt sehr breit angelegt, um die vielfältigen Kommunikationswege zwischen den einzelnen Immunzellen im Hinblick auf die Lebendimpfung mit dem *Gelbfiebertvirus* zu analysieren. An jedem Blutabnahmetag wurden daher die Zytokinkonzentrationen im Serum von 40 verschiedenen Zytokinen für jeden Probanden semiquantitativ bestimmt (4.2.5.1). Die Normalisierung erfolgte über eine auf den Membranen aufgebrauchte Positivkontrolle.

In der folgenden Abbildung 5.3 ist die Chemolumineszenzaufnahme einer Membran dargestellt. Jeweils als Doppelbestimmung sind die Detektionspunkte der einzelnen Zytokine sichtbar. Die Intensität der Chemolumineszenz ist der Menge an gebundenem Zytokin proportional und wird über einen Chemolumineszenzreader optisch quantifiziert. Beispielhaft sind einige der nachgewiesenen Zytokine eingetragen.

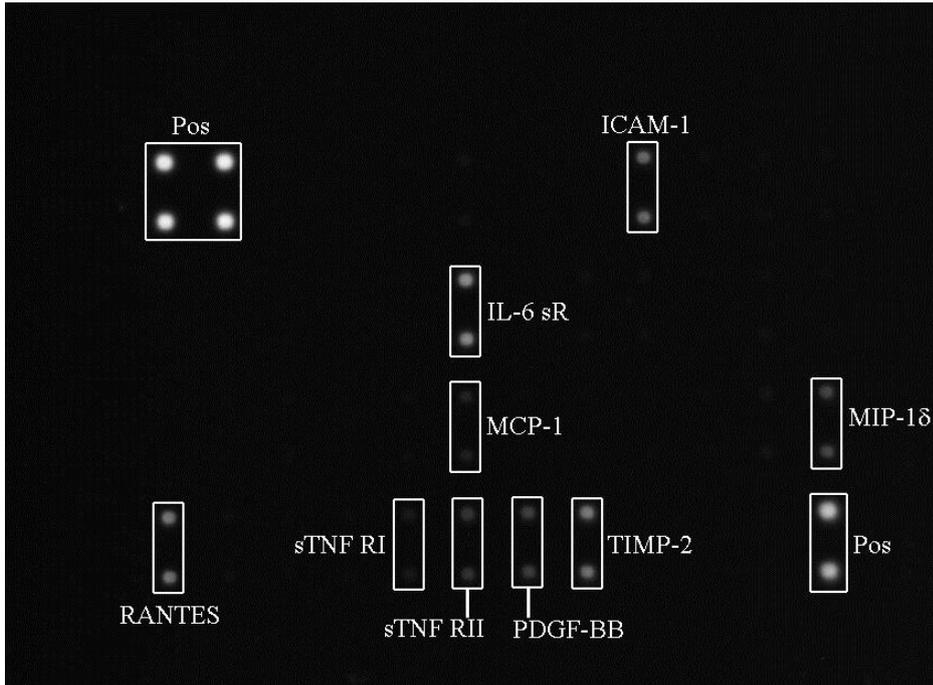


Abbildung 5.3: Chemolumineszenzsignale eines Zytokinarrays.

Dargestellt ist der Zytokinarray des Probanden #06 von Tag 14 nach Impfung. Die Membran wurde mit dem Probandenserum inkubiert, um die Zytokine zu binden. Durch spezifische Antikörper kommt es über eine Streptavidin-Biotin-Bindung zur Rekrutierung einer Peroxidase, die nach Zugabe der entsprechenden Substrate eine Chemolumineszenzentwicklung katalysiert. Die Signalintensität wird an einem Chemolumineszenzreader ausgelesen und quantifiziert (siehe 4.2.5.1).

Bei der Analyse der Daten zeigte sich, dass zwei Probanden (#12, #20) ein stark abweichendes Expressionsmuster und -level der Zytokine aufwiesen. Um zu entscheiden, ob es sich bei den Messwerten statistisch um Ausreißer handelt, wurde der Grubbs-Test (4.2.8) auf die Daten angewandt. Für 20 Zytokine waren Daten von mindestens zehn Probanden vorhanden, sodass der Test durchgeführt werden konnte. Ein Zytokin-Datensatz wurde als Ausreißer definiert, wenn der Test an mindestens drei Messtagen den entsprechenden Probanden als Ausreißer identifiziert hatte. Der Proband #20 wurde in 18 Fällen (90 %) und #12 in 19 Fällen (95 %) als Ausreißer eingestuft. Aus diesem Grund wurden die Daten dieser beiden Probanden nicht in die Medianbestimmung und die Kollektivanalyse der Zytokinmuster eingeschlossen. Ihre Zytokindaten wurden gesondert in Abschnitt 5.2.5 untersucht.

Für jedes einzelne Zytokin wurde für jeden Blutabnahmetag der Median aller 16 Probanden ermittelt und ist in Tabelle 5.11 angegeben, wobei es sich um prozentuale Angaben bezogen auf die Positivkontrolle handelt. Median-Messwerte unter 1 % sind hellgrau dargestellt.

25 Zytokine (62 %) zeigten keine oder nur eine sehr geringe (<1 %) Nachweisbarkeit. Die restlichen 15 Zytokine (38 %) waren im Serum der Probanden mit Messwerten über 1 % der Positivkontrolle nachweisbar. Tabelle 5.11 zeigt, dass insgesamt drei von neun Zytokinen

(IFN γ , IL-12p40 und IL-12p70), die einer T_H1-Immunantwort zugeordnet werden können, nachgewiesen wurden. Von den sechs T_H2 assoziierten Zytokinen ließ sich im Median keines nachweisen. Des Weiteren ließen sich sechs Chemokine (IL-8, I-309, MCP-1, MIP-1 β , MIP-1 δ , sowie RANTES) detektieren. Ebenfalls nachweisbar waren drei lösliche Rezeptoren (sICAM-1, IL-6 sR und sTNF-RII), ein Wachstumsfaktor (PDGF-BB), ein Inhibitor von Matrixproteasen (TIMP-2) sowie ein klassisches inflammatorisches Zytokin (IL-1 α).

Tabelle 5.11: Medianwerte aller Zytokine des Analysekollektivs.

Die Werte entsprechen dem Median der Zytokinmesswerte der 16 untersuchten Probanden in Prozent, bezogen auf die Positivkontrolle. Hellgrau dargestellte Werte liegen unter 1 % des Messsignals.

Zytokin	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 28
IL-2 ¹ , IP-10 ^{1,C} , MIG ^{1,C} , TNF β ¹ IL-3 ^{1,2} , GM-CSF ^{1,2} , IL-4 ² , IL-6 ² , IL-10 ² , IL-13 ² ,	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eotaxin ^C , Eotaxin-2 ^C , MCP-2 ^C , MIP-1 α ^C	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-1 β , IL-7, IL-11, IL-15, IL-16, IL-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TGF β 1, TNF α	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-CSF, M-CSF	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sTNF-RI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IFN γ ¹	0	0	1	0	1	0	1	1	1
IL-12p40 ¹	3	3	3	2	2	2	3	3	3
IL-12p70 ¹	4	5	7	5	5	5	8	5	4
IL-1 α	6	7	8	7	7	5	9	6	6
PDGF-BB	23	21	18	22	18	17	15	17	22
TIMP-2	46	41	41	40	38	40	38	38	52
sICAM-1	36	35	34	31	30	31	32	30	42
IL-8 ^C	1	0	0	0	0	0	0	0	1
I-309 ^C	2	3	2	2	2	2	3	2	2
MCP-1 ^C	2	4	3	3	5	5	3	3	5
MIP-1 β ^C	4	5	4	4	4	4	5	4	5
MIP-1 δ ^C	33	31	29	26	25	28	28	27	29
RANTES ^C	24	23	24	24	23	22	24	22	35
IL-6 sR	36	34	33	31	31	30	34	32	44
sTNF-RII	10	9	9	9	8	12	11	8	8

^{1/2} bezeichnet Zytokine die eine T_H1/T_H2-Immunantwort charakterisieren, ^C bezeichnet Chemokine

Die Veränderungen der Expression nachweisbarer Zytokine wurden auf ihre Signifikanz hin untersucht. Dazu wurden die Mediane des Tages null mit den Medianen der darauf folgenden Tage jeweils einzeln mittels der Wilcoxon-Analyse verglichen. Dieser Test untersucht durch ein Rangsummenverfahren, ob die beiden abhängigen Gruppenstichproben Unterschiede in der Messwertverteilung aufweisen. Die daraus resultierende Aussage ist, dass sich die Zytokinexpression des Kollektivs an einem bestimmten Tag signifikant von

Tag null unterscheidet. Die Ergebnisse in Form der p-Werte sind in Tabelle 5.12 dargestellt. Hierbei bezeichnen hellgraue Werte eine Tendenz mit $0,1 > p > 0,05$ und schwarze Zahlen mindestens eine Signifikanz von $p < 0,05$. Die Pfeile geben an, ob sich der Wert in Bezug auf Tag null erhöht (\uparrow) oder erniedrigt (\downarrow) hat. Ein Zytokin (PDGF-BB) zeigte an allen Tagen mindestens tendenzielle Veränderungen, IL-6 sR an sieben Tagen, TIMP-2 an sechs Tagen, sICAM-1 und sTNF-RII an fünf Tagen. Sieben weitere Zytokine (IFN γ , IL-12p70, IL-1 α , I-309, MCP-1, MIP-1 δ und RANTES) zeigten an weniger als vier Tagen mindestens tendenzielle Veränderungen im Zeitverlauf.

Sechs Zytokine (IFN γ , IL-12p70, IL-1 α , I-309, MCP-1 und RANTES) zeigten im Verlauf der Untersuchung einen Anstieg im Vergleich zu Tag null und vier (PDGF-BB, TIMP-2, sICAM-1 und MIP-1 δ) einen Konzentrationsabfall. Bei zwei Zytokinen (IL-6 sR und sTNF-RII) zeigte sich sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung. Da die Konzentration vom IL-6 sR nur an Tag 28 einen Anstieg zeigte, wurde dieses Zytokin jedoch als Konzentrationsabnahme im Studienverlauf gewertet.

Tabelle 5.12: Signifikanzanalyse der nachweisbaren Zytokine.

Dargestellt sind die p-Werte der Wilcoxon-Analyse aller im Median nachweisbaren Zytokine. Untersucht wurde die Signifikanz der Messwertunterschiede jedes Tages mit den Referenzwerten an Tag null. Schwarze Zahlen bezeichnen signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$, hellgraue Zahlen eine Tendenz mit $0,1 > p > 0,05$. Die Pfeile an den einzelnen p-Werten geben an, ob es sich um eine Erniedrigung (\downarrow) oder eine Erhöhung (\uparrow) in Bezug zu Tag null handelt. Neben der Bezeichnung der einzelnen Zytokine sind die Veränderungen über den Studienzeitraum dargestellt. \uparrow bezeichnet eine höhere Expression nach der Impfung, \downarrow eine niedrigere. Ist keine eindeutige Richtung zu erkennen ist dies durch $\uparrow\downarrow$ gekennzeichnet.

Zytokin	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 28
IFN γ ¹ \uparrow	-	-	-	0,021 \uparrow	-	0,016 \uparrow	0,064 \uparrow	0,041 \uparrow
IL-12p70 ¹ \uparrow	-	0,023 \uparrow	-	-	-	0,003 \uparrow	-	-
IL-1 α \uparrow	-	0,047 \uparrow	-	-	-	0,008 \uparrow	-	-
PDGF-BB \downarrow	0,010 \downarrow	0,047 \downarrow	0,013 \downarrow	0,030 \downarrow	0,005 \downarrow	0,005 \downarrow	0,020 \downarrow	0,098 \downarrow
TIMP-2 \downarrow	0,030 \downarrow	-	0,026 \downarrow	0,063 \downarrow	0,001 \downarrow	0,004 \downarrow	0,030 \downarrow	-
sICAM-1 \downarrow	-	0,019 \downarrow	0,020 \downarrow	-	0,034 \downarrow	0,069 \downarrow	0,031 \downarrow	-
I-309 ^C \uparrow	-	-	-	-	-	0,015 \uparrow	-	-
MCP-1 ^C \uparrow	-	-	-	-	0,003 \uparrow	-	-	0,006 \uparrow
MIP-1 δ ^C \downarrow	-	-	0,049 \downarrow	0,034 \downarrow	-	-	0,070 \downarrow	-
RANTES ^C \uparrow	-	-	-	-	-	-	-	0,010 \uparrow
IL-6 sR \downarrow	-	0,005 \downarrow	0,002 \downarrow	0,044 \downarrow	0,003 \downarrow	0,063 \downarrow	0,026 \downarrow	0,098 \uparrow
sTNF-RII $\uparrow\downarrow$	0,049 \downarrow	0,005 \downarrow	0,039 \downarrow	-	0,070 \uparrow	-	0,063 \downarrow	-

^{1/2} bezeichnet Zytokine die eine T_H1/T_H2-Immunantwort charakterisieren, ^C bezeichnet Chemokine

Die Abbildung 5.4 auf Seite 90 stellt die zeitlichen Expressionsverläufe der Zytokine PDGF-BB (A), TIMP-2 (B), IL-6 sR (C), sICAM-1 (D), sTNF-RII (E) und IFN γ (F) aus den Daten der Tabelle 5.11 dar. Die Messwerte sind als prozentuales Expressionslevel in Bezug zur Positivkontrolle dargestellt. Die Boxen umschließen die Messdaten zwischen dem 25.

und 75. Perzentil, der Querstrich markiert den Median. Die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen absoluten Maximal- bzw. Minimalwerte an.

In der Abbildung 5.4 A sind die Ergebnisse des Zytokins PDGF-BB dargestellt. Im Vergleich zu den Messwerten an Tag null (23 % Messsignal) zeigt sich ein signifikanter Rückgang des Expressionslevels beginnend am ersten Tag nach der Impfung. Das Minimum wurde an Tag zehn mit 17 % ($p < 0,01$) erreicht, woraufhin sich die Werte dem Level vor der Impfung annäherten, es bis zum 28. Tag (22 %) allerdings nicht wieder vollständig erreichten.

Ähnlich wie bei PDGF-BB zeigte TIMP-2 (Abbildungsteil B) im Vergleich zu der Referenzprobe von Tag null (45 %) eine signifikante Abnahme der Expression. Die Werte sanken an den Tagen 4 und 14 auf ein Minimum von 38 %, wobei der Wert an Tag vier nicht signifikant war. Die Expressionsreduktion hielt bis zum 14. Tag nach der Impfung an. An Tag 28 wurde eine nicht signifikante Steigerung des Wertes auf 52 % gemessen.

Auch für das Expressionslevel vom IL-6 sR zeigte sich ein ähnliches Bild, wie in Abbildung 5.4 C dargestellt. Ausgehend von einem Wert von 35 % an Tag null kam es an den folgenden Untersuchungstagen zu einer Reduktion der Expression, die bis auf die Tage eins und zehn signifikant war. Das Minimum wurde an Tag sieben mit einem Messwert von 30 % ($p < 0,01$) erreicht. Das niedrigere Expressionslevel zeigte sich bis zu Tag 14 nach Impfung. Am letzten Untersuchungstag wurde ein Medianwert (44 %) oberhalb des Ausgangswertes an Tag null erreicht, der jedoch nicht signifikant war.

Für das Zytokin sICAM-1 wurde nach der Impfung eine Abnahme gemessen (Abbildungsteil D). Ausgehend von einem Expressionslevel von 36 % an Tag null, wurde bereits einen Tag nach der Impfung eine Abnahme sichtbar, die an den Tagen 3 bis 7 und 14 ein Minimum von etwa 30 % erreichte. An Tag 28 nach der Impfung kam es zu einem Anstieg bis auf 42 %, der jedoch nicht signifikant war.

Der Verlauf der Expression des sTNF-RII ist in Teilabbildung E dargestellt. Vor der Impfung wurde für dieses Zytokin eine relative Expression von 10 % gemessen, die an den Tagen eins bis drei auf etwa 8,5 % ($p < 0,05$) absank. Am vierten Tag fiel der Wert weiter auf etwa 8 %. An den beiden darauf folgenden Messtagen wurde Werte oberhalb des Ausgangsniveaus mit 12 bzw. 10,5 % gemessen. Daraufhin fielen die Messwerte an den Tagen 14 und 28 wiederum auf etwa 8 % ab.

Die Messwerte für Interferon gamma müssen als grenzwertig angesehen werden, wie Abbildung 5.4 F zeigt, jedoch konnte im Verlauf der Studie eine sehr leichte Expression gezeigt werden. Bis zum zweiten Tag stieg die Expression nicht signifikant auf etwa 0,75 % an. An Tag drei konnte wiederum im Median keine Expression festgestellt werden. Ab dem

vierten Tag nach der Impfung schwankte der Wert um etwa 0,6 %, wobei für die Tage 4, 10 und 28 die Signifikanz der Werte belegt werden konnte ($p < 0,05$).

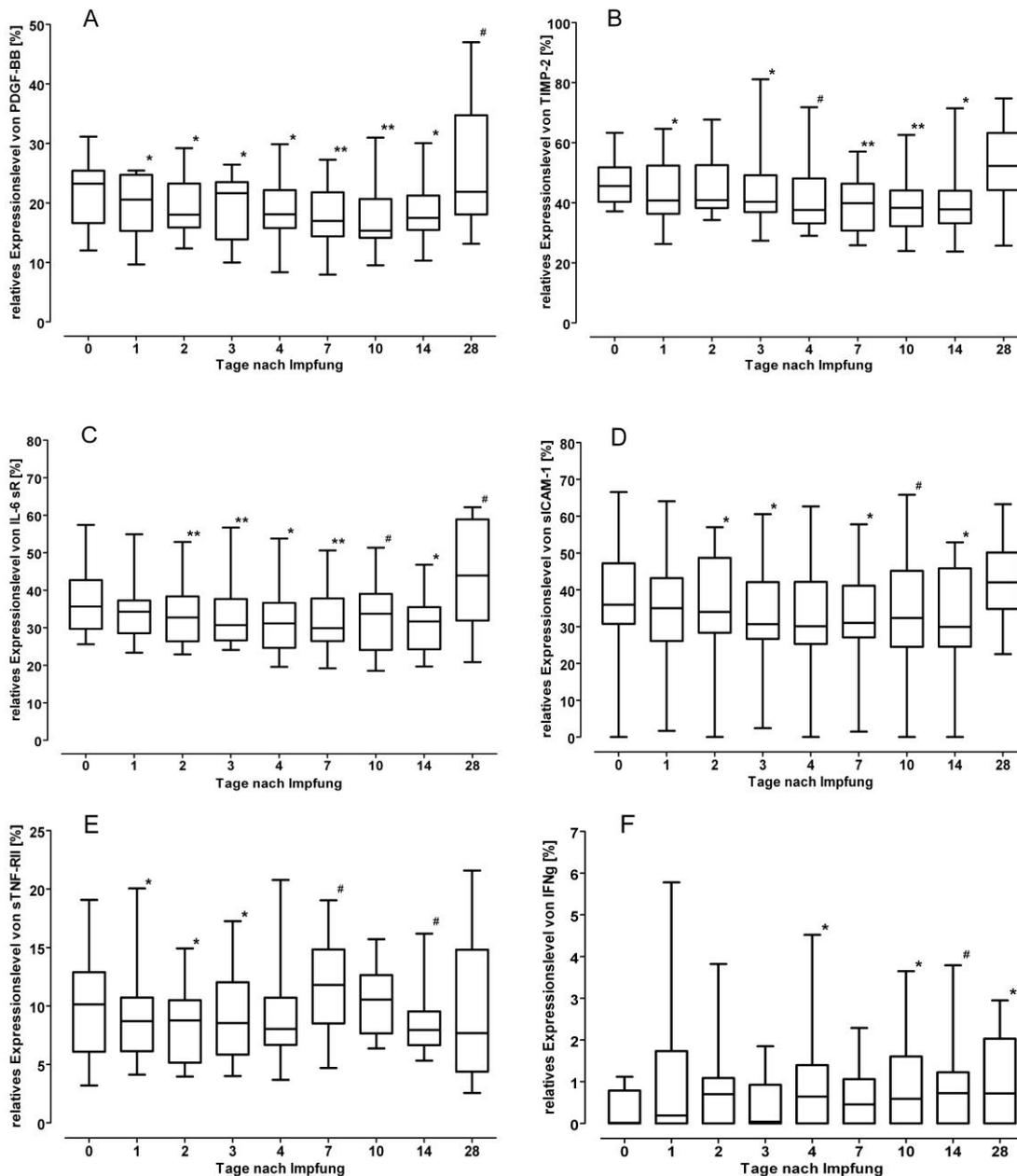


Abbildung 5.4: Zeitlicher Verlauf der Messwerte der Zytokine PDGF-BB, TIMP-2, IL-6 sR, sICAM-1, sTNF-RII und IFN γ im Serum der Probanden.

Für die Zytokine PDGF-BB (A), TIMP-2 (B), IL-6 sR (C), sICAM-1 (D), sTNF-RII (E) und IFN γ (F) sind die jeweiligen prozentualen Expressionslevel in Bezug zur Positivkontrolle dargestellt. Die Messwerte der Probanden werden als Box-Whisker Plot dargestellt. Die Box umschließt die Messdaten zwischen dem 25. und 75. Perzentil, der Querstrich stellt den Median dar. Die Fehlerbalken bezeichnen die äußersten Messergebnisse. Die Signifikanzen zwischen Tag null und jedem nachfolgenden Untersuchungstag wurden mittels Wilcoxon-Analyse getestet, * bezeichnet signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$, ** signifikante Veränderungen mit $p < 0,01$ und # bezeichnet tendenzielle Veränderungen mit $0,1 > p > 0,05$.

Neben den Analysen der Veränderung der Zytokinexpression über die Zeit wurden außerdem die Musterunterschiede zwischen verschiedenen Probandengruppen analysiert.

Die Gruppierung in PCR-positive und -negative Probanden basiert auf den Ergebnissen der GFV-PCR (Tabelle 5.6 auf Seite 78). Untersucht wurde hierbei, ob es an den einzelnen Untersuchungstagen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gab. Die Signifikanzprüfung wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt, der durch ein Rangsummenverfahren die beiden unabhängigen Gruppenstichproben auf Unterschiede in der Messwertverteilung untersucht.

In der Tabelle 5.13 sind die Ergebnisse in Form der p-Werte aller Zytokine dargestellt, die an mindestens einem Tag einen Unterschied aufwiesen. Schwarze Zahlen markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) und hellgraue Zahlen tendenzielle Unterschiede ($0,1 > p > 0,05$). In der PCR-positiv Gruppe wurde nur MCP-1 an einem Tag in einer höheren Konzentration gemessen. IL-8 (ein Tag), I-309 (ein Tag), MIP-1 δ (zwei Tage) und RANTES (zwei Tage) wurden in der PCR-positiv Gruppe weniger stark exprimiert als in der Vergleichsgruppe.

Tabelle 5.13: Signifikanzanalyse der Zytokinexpressionsunterschiede zwischen den Probandengruppen PCR-positiv und PCR-negativ.

Gemäß der Ergebnisse der GFV-PCR (siehe Tabelle 5.6 auf Seite 78) wurden die Gruppen PCR-negativ und PCR-positiv gebildet. Durch den U-Test wurden die Expressionsmusterunterschiede dieser beiden Gruppen für jeden Untersuchungstag auf Signifikanz untersucht. Dargestellt sind alle Zytokine, die mindestens an einem Tag einen tendenziellen Unterschied aufweisen. Schwarze Zahlen bezeichnen signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$, hellgraue Zahlen eine Tendenz mit $0,1 > p > 0,05$. Die Pfeile geben an, ob die PCR-positive Gruppe im Vergleich einen höheren (\uparrow) oder niedrigeren (\downarrow) Wert als die PCR-negative Gruppe aufwies. Neben der Bezeichnung der einzelnen Zytokine sind die Veränderungen über den Studienzeitraum dargestellt. \uparrow bezeichnet eine höhere Expression in der PCR-positiv Gruppe, \downarrow eine niedrigere.

Zytokin	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 28
IL-8 ^c \downarrow	-	-	-	-	-	-	-	-	0,031 \downarrow
I-309 ^c \downarrow	-	-	-	-	-	0,031 \downarrow	-	-	-
MCP-1 ^c \uparrow	-	-	-	-	-	0,042 \uparrow	-	-	-
MIP-1 δ ^c \downarrow	0,031 \downarrow	0,012 \downarrow	-	-	-	-	-	-	-
RANTES ^c \downarrow	-	-	-	-	-	0,055 \downarrow	0,012 \downarrow	-	-

^{1/2} bezeichnet Zytokine die eine T_H1/T_H2-Immunantwort charakterisieren, ^c bezeichnet Chemokine

Eine weitere Einteilung in die Gruppen PRNT-hoch (Titer $> 1:58$) und PRNT-niedrig (Titer $< 1:58$) wurde anhand der Ergebnisse des Neutralisationstiter an Tag 14 (Tabelle 5.9) durchgeführt.

In der Tabelle 5.14 sind sämtliche Zytokine angegeben, bei denen zumindest an einem Tag eine Tendenz feststellbar war. Schwarze Zahlen markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), hellgraue Zahlen tendenzielle Unterschiede ($0,1 > p > 0,05$). Die Zytokine IL-6 sR sowie IFN γ wiesen an drei Tagen einen Unterschied auf, wobei beide Zytokine in der PRNT-hoch Gruppe stärker exprimiert wurden. PDGF-BB und MIP-1 β zeigten an zwei Tagen, I-309 und MCP-1 an einem Tag einen Unterschied. Die Zytokine PDGF-BB und MCP-1 wurden in der PRNT-hoch Gruppe weniger stark exprimiert, MIP-1 β und MCP-1 dagegen höher.

Tabelle 5.14: Signifikanzanalyse der Zytokinexpressionsunterschiede zwischen den Probandengruppen PRNT-hoch und PRNT-niedrig an Tag 14.

Basierend auf den Ergebnissen des PRN-Test an Tag 14 (siehe Tabelle 5.9 auf Seite 84) wurden die Probanden in die Gruppen PRNT-hoch und PRNT-niedrig eingeteilt. Durch den U-Test wurden die Expressionsmusterunterschiede dieser beiden Gruppen für jeden Untersuchungstag auf Signifikanz untersucht. Dargestellt sind alle Zytokine, die mindestens an einem Tag einen tendenziellen Unterschied aufweisen. Schwarze Zahlen bezeichnen signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$, hellgraue Zahlen eine Tendenz mit $0,1 > p > 0,05$. Die Pfeile geben an, ob die PRNT-hoch Gruppe im Vergleich einen höheren (↑) oder niedrigeren (↓) Wert als die PRNT-niedrig Gruppe auswies. Neben der Bezeichnung der einzelnen Zytokine sind die Veränderungen über den Studienzeitraum dargestellt. ↑ bezeichnet eine höhere Expression in der PRNT-hoch Gruppe, ↓ eine niedrigere.

Zytokin	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 28
IFN γ ¹ ↑	0,023 ↑	-	-	-	0,071 ↑	0,055 ↑	-	-	-
PDGF-BB ↓	-	-	0,094 ↓	0,091 ↓	-	-	-	-	-
I-309 ^C ↑	-	-	-	-	0,042 ↑	-	-	-	-
MCP-1 ^C ↓	-	-	0,094 ↓	-	-	-	-	-	-
MIP-1 β ^C ↑	-	-	-	0,055 ↑	0,016 ↑	-	-	-	-
IL-6 sR ↑	-	-	-	-	0,091 ↑	0,055 ↑	-	0,031 ↑	-

^{1/2} bezeichnet Zytokine die eine T_H1/T_H2-Immunantwort charakterisieren, ^C bezeichnet Chemokine

5.2.4 Vergleich der Daten mit der zellulären Immunreaktion

Ziel der Studie war es einen möglichst umfassenden Überblick über die immunologischen Reaktionen nach einer GF-Impfung zu erhalten. Im folgenden Abschnitt werden die bereits beschriebenen Daten mit den zellulären Immunparametern kombiniert, die im Rahmen der Promotion von Frau Nicole Bethke erhoben wurden.

5.2.4.1 Untersuchung zellulärer Parameter in Abhängigkeit der Virämie

Die Untersuchung der Virämie zeigte, dass in dieser Studie Virusgenomäquivalente von Tag zwei bis Tag sieben nachweisbar waren (siehe Tabelle 5.6 auf Seite 78). Die Möglichkeiten der immunologischen Reaktion sind daher hauptsächlich auf die angeborene Immunität beschränkt. Die Zellkonzentrationen der einzelnen Zellarten wurden dahingehend untersucht, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Probanden mit messbarer Virämie und denjenigen ohne Virämie bestand. Für myeloide dendritische Zellen (mDZ) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) konnten solche Zusammenhänge gefunden werden. Im Folgenden werden zunächst die Veränderungen der Zellkonzentrationen im Serum für das gesamte Kollektiv dargestellt. Die Konzentrationsveränderungen zwischen den einzelnen Untersuchungstagen wurden mit dem Wilcoxon-Test auf Signifikanz untersucht.

Die myeloiden dendritischen Zellen erfüllen eine Kernfunktion bei der Initiierung einer Immunreaktion. Sie sind speziell für die Präsentation von Antigenen mit MHC I- und MHC II-Molekülen sowie mit diversen costimulatorischen Rezeptoren ausgestattet und können andere Immunzellen erfolgreich aktivieren [151].

Die Abbildung 5.5 zeigt den zeitlichen Verlauf der mDZ-Zellzahl pro Mikroliter Blut der Probanden. Vor der Impfung wurde ein Median von 1,1 Zellen/ μ L nachgewiesen. Ab Tag zwei wurde ein stetiger Anstieg der Zellzahl verzeichnet, wobei an Tag sieben ein hochsignifikantes ($p < 0,01$) Maximum mit 2,2 Zellen/ μ L nachgewiesen wurde. Bis zu Tag 14 fiel die Zellzahl wieder ab und erreichte an diesem Tag einen signifikant niedrigeren Wert mit 0,86 Zellen/ μ L ($p < 0,05$). Bis zu Tag 28 normalisierten sich die Werte wieder im Bereich des Ausgangswertes.

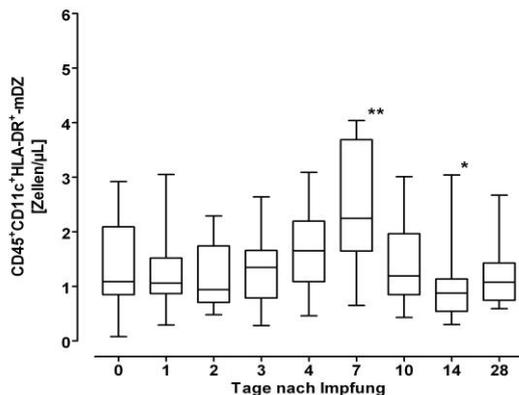


Abbildung 5.5: Zeitlicher Verlauf der Konzentration myeloider dendritischer Zellen im Blut der Probanden. Für jeden Studientag ist die gemessene Zellzahl pro Mikroliter Blut der myeloiden dendritischen Zellen als Box-Whisker-Plot dargestellt. Die Box umschließt die Messdaten zwischen dem 25. und 75. Perzentil, der Querstrich stellt den Median dar. Die Fehlerbalken bezeichnen die äußersten Messergebnisse. * bezeichnet signifikante Daten mit $p < 0,05$, ** mit $p < 0,01$ in der Wilcoxon-Analyse.

Die zweite Zellklasse mit signifikanten Unterschieden waren die natürlichen Killerzellen, die infizierte Zellen erkennen und abtöten können, ohne vorher durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert worden zu sein. Sie leisten dabei einen entscheidenden Beitrag zur schnellen Eindämmung einer Infektion bis die adaptive Immunantwort ausgebildet ist. In dieser Studie wurden zwei Arten von NK-Zellen untersucht, die verschiedene Funktionen besitzen. Diejenigen Zellen, die den Oberflächenmarker CD56 besonders stark exprimieren und kein CD16 besitzen ($CD56^{bright}CD16^{-}$), zeichnen sich durch eine besonders effektive Ausschüttung von Zytokinen, insbesondere $IFN\gamma$, aus. Zellen die eher cytolytisch wirken, exprimieren CD56 in geringerem Maße, weisen dafür aber CD16 auf und werden daher als $CD56^{dim}CD16^{+}$ bezeichnet.

In der folgenden Abbildung 5.6 A sind die Ergebnisse für die $CD56^{bright}CD16^{-}$ -Zellen und in Abbildungsteil B die Ergebnisse für die $CD56^{dim}CD16^{+}$ -Zellen dargestellt. Die $CD56^{bright}$ -Zellen wiesen ein genau entgegengesetztes Verhalten zu den mDZs (Abbildung 5.5) auf. In Abbildung 5.6 A ist gezeigt, dass es beginnend an Tag vier zu einem Abfall der Zellkonzentration von etwa 7 Zellen/ μ L an Tag null auf etwa 4 Zellen/ μ L an Tag sieben ($p < 0,01$) kam. Anschließend stieg die Zellzahl wieder an und erreichte an den folgenden

Messtagen einen Wert von etwa 6 Zellen/ μ L. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den CD56^{dim} cytolytischen Zellen (Abbildung 5.6 B) ausgehend von etwa 140 Zellen/ μ L an Tag null bereits ab Tag zwei ein Abfall der Zellzahl. Abgesehen von den Tagen zwei und zehn handelt es sich an allen anderen Tagen um eine signifikante Reduktion. Ein minimaler Wert wurde an den Tagen 3 und 14 mit ca. 90 Zellen/ μ L ($p < 0,05$) erreicht. Bis zum Ende der Studie konnte kein Rückgang zu den Ausgangswerten festgestellt werden.

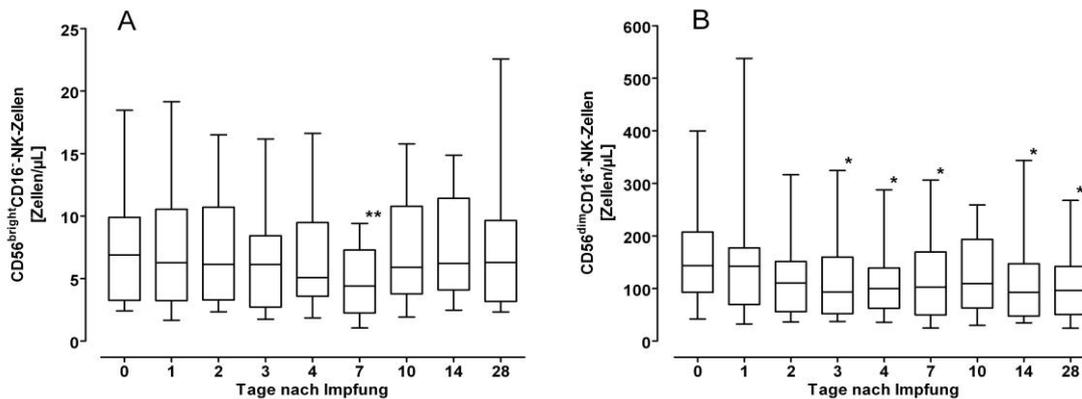


Abbildung 5.6: Zeitliche Verläufe der Konzentration von zytokinausschüttenden (CD56^{bright}CD16⁻)- und cytolytischen (CD56^{dim}CD16⁺)-NK-Zellen im Blut.

Dargestellt sind jeweils die Zellzahlen pro Mikroliter Blut in Abhängigkeit der Untersuchungstage. Die Box umschließt die Messdaten zwischen dem 25. und 75. Perzentil, der Querstrich bezeichnet den Median. Die Fehlerbalken stellen die äußersten Messergebnisse dar. Abbildung A zeigt die Ergebnisse für die CD56^{bright}CD16⁻-NK-Zellen, Abbildung B die Ergebnisse für die CD56^{dim}CD16⁺-NK-Zellen. * bezeichnet signifikante Daten mit $p < 0,05$, ** mit $p < 0,01$ in der Wilcoxon-Analyse.

Die Untersuchung auf signifikante Unterschiede der Zellzahl in Abhängigkeit einer nachweisbaren Virämie ergab die in der im Folgenden gezeigten Abbildung 5.7 dargestellten Resultate. Die Messwerte sind in Zellen pro Mikroliter Blut als Box-Whisker-Plot mit den entsprechenden Signifikanzwerten dargestellt. Abbildungsteil A zeigt die Ergebnisse für die cytolytischen NK-Zellen (CD56^{dim}CD16⁺). Über den gesamten Untersuchungszeitraum zeigte sich, dass die Mediane der PCR-positiven Gruppe über denen der PCR-negativen Gruppe lagen. An den Tagen 0, 4, 7 und 14 war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen signifikant. Die PCR-positive Gruppe zeigte an Tag null einen Median von etwa 210 Zellen/ μ L, der bis zum vierten Tag auf 130 Zellen/ μ L abnahm. Am siebten Tag kam es zu einem Anstieg auf 170 Zellen/ μ L und im Anschluss daran wieder zu einem Absinken des Medians auf 100 Zellen/ μ L an Tag 28. Ein ähnliches Bild ergab sich bei den dendritischen Zellen in Abbildung 5.7 B, deren Konzentration im Gegensatz zu den anderen Zellklassen nicht als absolute Zellzahl bestimmt wurde sondern als Intensitätsmessung des FACS-Fluoreszenzsignals, welches Proportional zu der Zellzahl ist. Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurden in den PCR-positiven Probanden höhere mDZ-Konzentrationen gemessen als in der Gruppe PCR-negativ. An den Tagen null, eins und zwei

handelte es sich um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei der PCR-positiven Gruppe wurde an den Untersuchungstagen null, eins, zwei, vier und sieben Werte um 12.600 Fluoreszenzeinheiten (FE) gemessen. Am dritten Tag kam es zu einem leichten Abfall der Konzentration auf 12.000 FE. Am zehnten Tag kam es zu einem kurzen Anstieg der Intensität auf 16.400 FE, auf den eine Abnahme auf 11.000 bzw. 11.500 FE an den Tagen 14 bzw. 28 folgte. Der Median der PCR-negativen Gruppe lag an Tag null bei 5.900 FE und stieg bis zu Tag vier auf 9.400 FE an. Am siebten und zehnten Tag wurde dieses hohe Niveau annähernd gehalten und fiel daraufhin auf Werte von 5.000 bzw. 6.000 an den Tagen 14 und 28 ab.

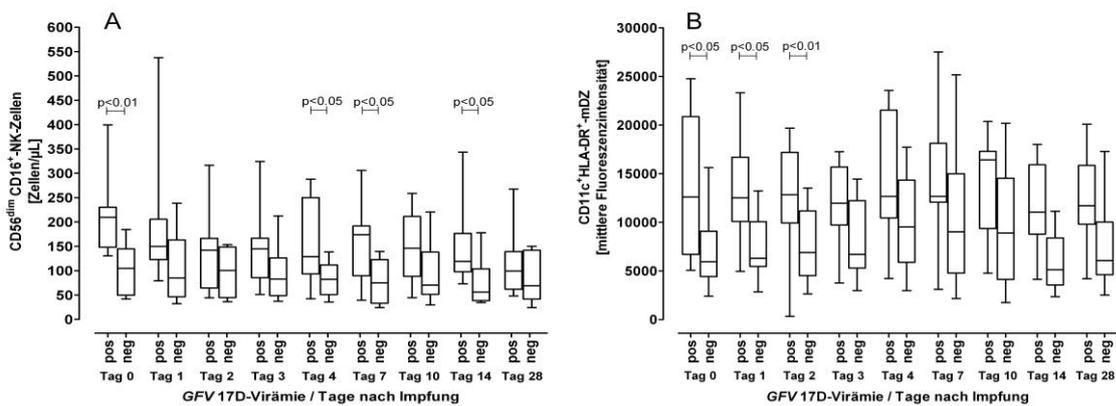


Abbildung 5.7: Vergleich der cytolytischen NK- und mDZ-Zellkonzentrationen im Blut in Abhängigkeit der Nachweisbarkeit der Virämie.

Dargestellt sind jeweils die gemessenen Zellzahlen pro Mikroliter Blut in Abhängigkeit der Untersuchungstage sowie der Probandengruppierung in PCR-negativ und PCR-positiv. Die Box umschließt die Messdaten zwischen dem 25. und 75. Perzentil, der Querstrich bezeichnet den Median. Die Fehlerbalken stellen die äußersten Messergebnisse dar. Abbildung A zeigt die Ergebnisse für die CD56^{dim}CD16⁺-NK-Zellen, Abbildung B die Ergebnisse für die myeloiden dendritischen Zellen. Die Signifikanzniveaus des Mann-Whitney-U-Tests sind über den Daten angegeben.

5.2.4.2 Untersuchung zellulärer Parameter in Abhängigkeit der Höhe des Neutralisationstiter an Tag 14

Das erstmalige Auftreten der gelbfieberspezifischen Antikörper konnte im IIFT (siehe Tabelle 5.7 auf Seite 81) auf die Tage 10 bzw. 14 festgelegt werden sofern nicht bereits vor der Impfung spezifische Antikörper vorhanden waren. Im Neutralisationstest lag die erstmalige Nachweisbarkeit der Antikörper zwischen Tag 7 und 14 (Tabelle 5.9 auf Seite 84). Vor dem Hintergrund der Einteilung in Probanden mit hohem und niedrigem PRNT-Titer an Tag 14 (siehe Seite 83) wurden die unterschiedlichen Zellarten auf signifikante Unterschiede untersucht.

Dabei konnte festgestellt werden, dass wiederum bei den NK-Zellen klare Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden. In der folgenden Abbildung 5.8 sind die Ergebnisse für

die cytolytischen (CD56^{dim}CD16⁺) sowie zytokinexprimierenden (CD56^{bright}CD16⁻) Subtypen der NK-Zellen dargestellt. In Abbildungsteil A ist ersichtlich, dass die Konzentration der zytokinausschüttenden CD56^{bright} NK-Zellen in der PRNT-hoch Studiengruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum einen niedrigeren Median aufwies als die PRNT-niedrig Gruppe. An den Tagen drei, vier und sieben konnte ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nachgewiesen werden. Der Median der PRNT-hoch Gruppe lag am ersten Untersuchungstag bei 5,3 Zellen/ μ L und fiel an den Tagen eins bis vier auf etwa 3,6 Zellen/ μ L ab. An Tag sieben fiel die Konzentration weiter auf 2,4 Zellen/ μ L ab. Anschließend kam es an Tag zehn zu einem kurzfristigen Anstieg auf 5 Zellen/ μ L, gefolgt von einem Absinken auf ein Niveau von etwa 4,3 Zellen/ μ L an den letzten beiden Tagen.

Für die PRNT-niedrig Gruppe wurde vor der Impfung ein Median von 8,5 Zellen/ μ L gemessen, der an Tag eins auf etwa 10 Zellen/ μ L anstieg. An Tag zwei wurde das Ausgangsniveau wieder erreicht und an den nachfolgenden Tagen kam es zu einer Abnahme des Expressionslevels auf 5 Zellen/ μ L an Tag sieben. Daraufhin kam es zu einem starken Anstieg auf 9,5 Zellen/ μ L an Tag zehn, wobei das Niveau an Tag 14 bereits wieder auf etwa 7 Zellen/ μ L abfiel. Am letzten Untersuchungstag stieg die Expression wieder auf 9 Zellen/ μ L an.

Das gleiche Bild zeigte sich auch bei den cytolytischen CD56^{dim} Zellen (Abbildungsteil B). Vor der Impfung wiesen beide Gruppen einen gleichhohen Median auf. Im Verlauf der Studie zeigte sich, dass die PRNT-hoch Gruppe einen niedrigeren Median an cytolytischen CD56^{dim} Zellen aufwies. Der Unterschied zwischen den Gruppen konnte an den Tagen eins, drei, vier und sieben als signifikant bestätigt werden. Ausgehend von etwa 140 Zellen/ μ L an Tag null sank der Median der PRNT-hoch Gruppe auf etwa 80 Zellen/ μ L an Tag eins. Am zweiten Tag stieg der Median leicht auf 90 Zellen/ μ L, woraufhin er an den darauf folgenden Tagen bis zum zehnten Tag wieder auf 80 Zellen/ μ L absank. An den beiden letzten Untersuchungstagen fiel die Zellkonzentration weiter auf etwa 50 Zellen/ μ L. Der Median der PRNT-niedrig Gruppe stieg an Tag eins auf 160 Zellen/ μ L. Daraufhin sank er wieder auf das Ausgangsniveau von etwa 140 Zellen/ μ L, welches bis zum zehnten Tag bestehen blieb. An den beiden letzten Untersuchungstagen sank die Zellkonzentration auf etwa 100 Zellen/ μ L ab.

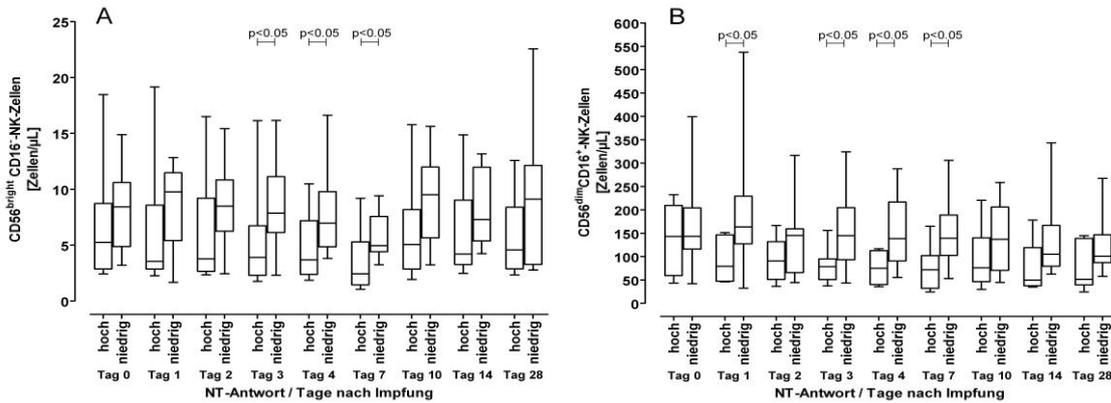


Abbildung 5.8: Vergleich der Konzentrationen von NK-Zellen in Abhängigkeit des neutralisierenden Antikörpertiters an Tag 14.

Dargestellt sind jeweils die gemessenen Zellzahlen pro Mikroliter Blut in Abhängigkeit der Untersuchungstage sowie der Probandengruppierung in PRNT-hoch und PRNT-niedrig. Die Box umschließt die Messdaten zwischen dem 25. und 75. Perzentil, der Querstrich bezeichnet den Median. Die Fehlerbalken stellen die äußersten Messergebnisse dar. Abbildung A zeigt die Ergebnisse für die CD56^{bright}CD16⁻-NK-Zellen, Abbildung B die Ergebnisse für die CD56^{dim}CD16⁺-NK-Zellen. Die Signifikanzniveaus des Mann-Whitney-U-Tests sind über den Daten angegeben.

5.2.4.3 Untersuchung der GFV-spezifischen CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen sowie der Plasmablasten

Verschiedene hochspezialisierte T-Zellen spielen bei der Abwehr einer viralen Infektion an mehreren wichtigen Positionen eine entscheidende Rolle. Die cytotoxischen CD8⁺ T-Zellen sind auf die Eindämmung der viralen Replikation durch die Vernichtung infizierter Zellen spezialisiert. Zur Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen, sowie der B-Zellen sind wiederum GFV-spezifische CD4⁺ T-Zellen notwendig, die sich im Verlauf der adaptiven Immunantwort als Reaktion auf die Virusinfektion ausbilden.

Um die Anzahl der GFV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zu bestimmen, wurde das Vollblut der Probanden *in vitro* mit GFV stimuliert (siehe 4.2.5.2.3) und die Expression des Aktivierungsmarkers CD40L (alternative Bezeichnung: CD154) [152] in der FACS-Analyse bestimmt. Die folgende Abbildung 5.9 A zeigt den zeitlichen Verlauf der Konzentration (Zellen/µL) der stimulierten GFV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Bei allen Probanden konnten im Verlauf der Studie spezifische CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. An Tag zwei konnte eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der Zellzahl von 0,19 auf 0,29 Zellen/µL festgestellt werden. An den Tagen drei (0,16 Zellen/µL) und vier (0,17 Zellen/µL) kehrte die Konzentration auf das Anfangsniveau zurück. Ab Tag zehn konnte ein signifikanter Anstieg der Zellen mit 0,53 Zellen/µL ($p < 0,01$) im Blut nachgewiesen werden, der seinen höchsten Wert an Tag 14 mit 0,57 Zellen/µL ($p < 0,01$) erreichte. Bis zu Tag 28 ging die Konzentration wieder zurück, blieb jedoch im Vergleich zum Niveau vor der Impfung weiterhin mit 0,42 Zellen/µL signifikant erhöht ($p < 0,01$).

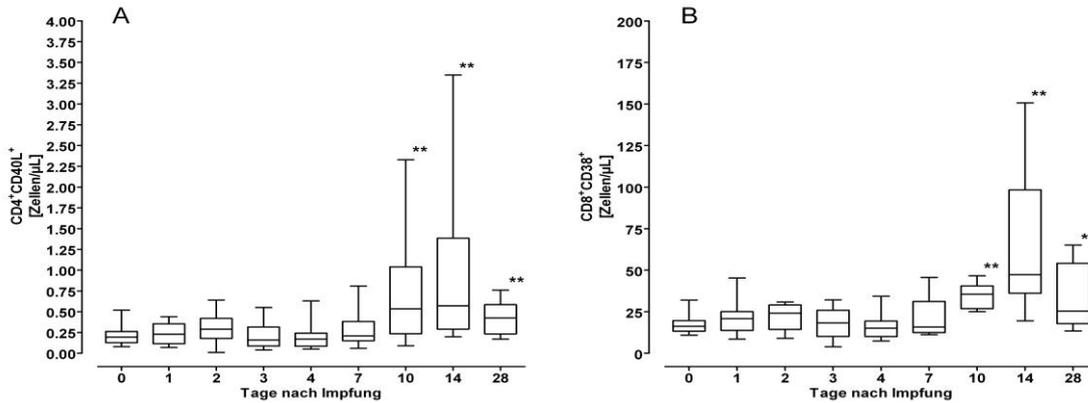


Abbildung 5.9: Zeitlicher Verlauf der Konzentration GFV-spezifischer CD4⁺ (A) sowie CD8⁺ T-Zellen (B) im Blut der Probanden.

Dargestellt ist die absolute Zellzahl der GFV-spezifischen CD4⁺CD40L⁺ T-Helferzellen (Abbildungsteil A) sowie der GFV-spezifischen CD8⁺CD38⁺ cytotoxischen T-Zellen (Abbildungsteil B) pro Mikroliter Vollblut. Die Messwerte der Probanden werden als Box-Whisker Plot dargestellt. Die Box umschließt die Messdaten zwischen dem 25. und 75. Perzentil, der Querstrich entspricht dem Median. Die Fehlerbalken bezeichnen die äußersten Messergebnisse. * bezeichnet signifikante Daten mit p<0,05, ** mit p<0,01 in der Wilcoxon-Analyse.

Neben den GFV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, die für die Aktivierung der adaptiven Immunität eine entscheidende Rolle spielen, ist die Aktivierung der GFV-spezifischen cytotoxischen CD8⁺ T-Zellen für die direkte Vernichtung infizierter Zellen unerlässlich. Analog zur Stimulierung der CD4⁺ T-Zellen wurden auch die CD8⁺ T-Zellen *in vitro* mit GFV stimuliert (siehe 4.2.5.2.3) und die spezifische Aktivierung der Zellen über die Expression des Aktivierungsmarkers CD38 [153] gemessen. Diese Untersuchung wurde erst im Laufe der Studie zu den Analysen hinzugenommen, sodass nur die Probanden #01, #02, #03, #05, #06, #07, #13, #16, #17 und #18 auf das Auftreten der GFV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen untersucht wurden. In der Abbildung 5.9 B ist die Zellzahl der aktivierten cytotoxischen T-Zellen (CD8⁺CD38⁺) im zeitlichen Verlauf dargestellt. Es zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie für die spezifischen T-Helferzellen in Abbildung 5.9 A. An den Tagen eins, zwei und drei konnte eine nicht signifikante Erhöhung der Zellzahl (21, 24 bzw. 18 Zellen/µL) im Vergleich zum Ausgangsniveau von 16 Zellen/µL gemessen werden. An den Tagen vier und sieben wurde wieder das Anfangsniveau erreicht. Ab dem zehnten Tag nach Impfung konnte bei den Probanden ein signifikanter Anstieg mit einem Signifikanzniveau von mindestens p<0,05 und Zellkonzentrationen von 36, 47 bzw. 26 Zellen/µL nachgewiesen werden.

Neben den T-Zellen spielt die humorale Immunantwort eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Infektionskrankheiten. Im Rahmen der Ausbildung einer adaptiven Immunantwort kommt es zur Proliferation von Plasmablasten. Diese Zellen wandeln sich daraufhin in Plasmazellen um, deren Hauptaufgabe die Sezernierung von Antikörpern ist. In der folgenden Abbildung 5.10 ist der Konzentrationsverlauf der Plasmablasten in den

Probanden dargestellt. Bis auf Tag zwei, an dem ein leichtes Absinken der Plasmablastenzahl registriert wurde (4,8 Zellen/ μ L), blieb die Zellzahl bis zu Tag vier konstant bei etwa 5,5 Zellen/ μ L, woraufhin sie dann an Tag sieben leicht, aber signifikant ($p < 0,05$) auf 4,5 Zellen/ μ L zurückging. An den Tagen 10 und 14 konnte eine deutliche Erhöhung auf 8,5 bzw. 12 Zellen/ μ L festgestellt werden ($p < 0,05$ bzw. $< 0,01$), was zeitlich dem Erreichen des maximalen Titers an neutralisierenden Antikörpern (Tabelle 5.9 auf Seite 84) entspricht. Bis zum 28. Tag nach Impfung blieb die Plasmablastenkonzentration mit 6,6 Zellen/ μ L leicht erhöht.

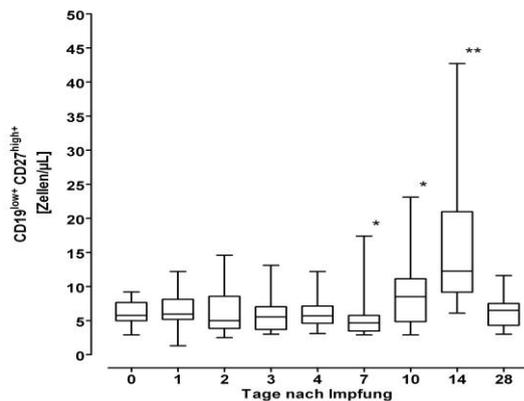


Abbildung 5.10: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Plasmablasten im Blut der Probanden.

Dargestellt ist die Anzahl der CD19^{low}CD27^{high+} Plasmablasten pro Mikroliter Blut in Abhängigkeit der Untersuchungstage. Die Box umschließt die Messdaten zwischen dem 25. und 75. Perzentil, der Querstrich entspricht dem Median. Die Fehlerbalken stellen die äußersten Messergebnisse dar. * bezeichnet signifikante Daten mit $p < 0,05$, ** eine Signifikanz mit $p < 0,01$ in der Wilcoxon-Analyse.

5.2.5 Betrachtung zweier Probanden (#20 und #12) mit abweichender Zytokinexpression

Zwei Probanden zeichneten sich bei den Untersuchungen durch extreme Zytokinexpressionsmuster aus. Sie wurden in dem Analysekollektiv belassen, jedoch in Bezug auf die Zytokinexpression gesondert analysiert.

In Tabelle 5.15 sind die Ergebnisse des Probanden #20 zusammengefasst. Bei ihm ließ sich an Tag vier eine schwache Virämie mit 252 GÄ/mL nachweisen. Im IIFT ließen sich beide AK-Klassen frühestens an Tag 14 nachweisen. Der IgM-Titer stieg von 1:100 auf 1:320 an Tag 28, wohingegen der IgG-Titer in diesem Zeitraum bei 1:100 konstant blieb. Neutralisierende Antikörper waren ab Tag zehn (Titer 1:44) nachweisbar und bewegten sich daraufhin in einem Bereich von 1:54 bis 1:63.

Tabelle 5.15: Analyseergebnisse des Probanden #20.

Untersuchung	Tage nach Immunisierung								
	0	1	2	3	4	7	10	14	28
GFV-PCR	-	-	neg	neg	252	neg	neg	-	-
IIFT-IgM	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:320
IIFT-IgG	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:100
PRNT	0	-	-	-	-	0	1:44	1:63	1:54

IIFT – indirekter Immunfluoreszenztest, PRNT – Neutralisationstest

Die Untersuchung der zellulären Parameter für den Probanden #20 ergab die in der Abbildung 5.11 dargestellten Daten. Gezeigt sind jeweils die Konzentrationen in Zellen pro Mikroliter Vollblut.

Die Plasmablasten wurden vor der Impfung in einer Konzentration von 6 Zellen/ μ L gemessen. Bis zu Tag drei fiel sie auf 4 Zellen/ μ L ab und stieg anschließend an den Tagen vier und sieben wieder auf das Ausgangsniveau an. Ab Tag zehn wurde ein deutlicher Anstieg mit einem Maximum von 18 Zellen/ μ L an Tag 14 gemessen. Bis zu Tag 28 fiel die Plasmablastenkonzentration wieder auf den Ursprungswert von 6 Zellen/ μ L ab.

Für die cytolytischen CD56^{dim} NK-Zellen wurde vor der Impfung eine Konzentration von etwa 200 Zellen/ μ L gemessen, die bis zu Tag drei auf etwa 84 Zellen/ μ L abfiel. Nach einem Anstieg bis zu Tag sieben (165 Zellen/ μ L) kam es erneut zu einer Abnahme der Konzentration auf 120 Zellen/ μ L an Tag 14. Am letzten Messtag konnte ein leichter Anstieg auf 145 Zellen/ μ L nachgewiesen werden.

Die Konzentration der zytokinausschüttenden CD56^{bright} NK-Zellen sank bereits am ersten Tag nach Impfung von etwa 5 Zellen/ μ L (Tag null) auf ihr Minimum von etwa 2 Zellen/ μ L an Tag sieben. Bis zu Tag 14 stieg die Konzentration auf etwa 7 Zellen/ μ L an und fiel zu Tag 28 hin wieder auf das Ausgangsniveau zurück.

Die myeloiden dendritischen Zellen wurden vor der Impfung in einer Konzentration von etwa einer Zelle/ μ L nachgewiesen. Bis zu Tag sieben gab es einen leichten Anstieg auf fast vier Zellen/ μ L. Daraufhin normalisierten sich die Werte bis zum 14. Tag wieder und stiegen an Tag 28 nochmals leicht auf 1,7 Zellen/ μ L an.

Die GFV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wiesen bis zum vierten Tag Werte um 0,2 Zellen/ μ L auf. Bis zu Tag zehn kam es zu einem Anstieg auf eine Zellkonzentration von 2,3 Zellen/ μ L im Blut. Daraufhin nahm die Konzentration wieder ab und erreichte an Tag 28 eine Konzentration von 0,5 Zellen/ μ L.

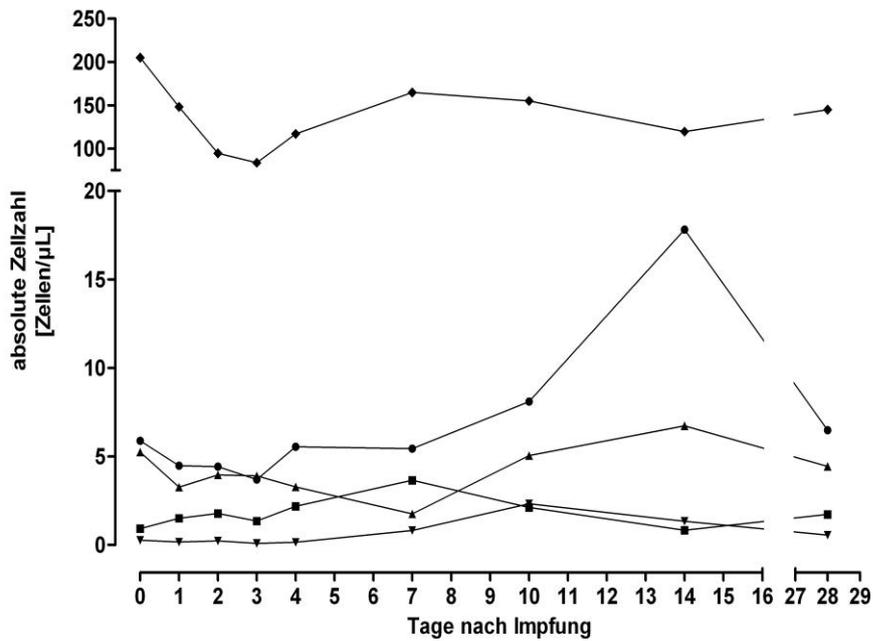


Abbildung 5.11: Zeitlicher Verlauf der Zellkonzentration von Plasmablasten, myeloiden dendritischen Zellen, GFV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen des Probanden #20.
 Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen pro Mikroliter Vollblut für die folgenden Zellpopulationen: (●) Plasmablasten, (■) myeloide dendritische Zellen, (▲) CD56^{bright} NK-Zellen, (◆) CD56^{dim} NK-Zellen und (▼) GFV-spezifische CD4⁺ T-Zellen.

Die Ergebnisse der Zytokinanalyse sind als prozentuale Expressionslevel, bezogen auf die Positivkontrolle, in der Tabelle 5.16 dargestellt. Die Expressionslevel des Probanden #20 wurden mit den Medianen des Analysekollektivs (siehe Tabelle 5.11 auf Seite 87) verglichen. Grün hinterlegte Felder zeigen eine mindestens 20 % höhere Expression des entsprechenden Zytokins, rote Hinterlegung eine um mindestens 20 % niedrigere Expression bei dem Probanden #20. Bis zu Tag vier nach der Impfung wurden alle Zytokine außer IL-1 β , IL-2/-3/-11/-13/-15/-16 und IL-17 deutlich exprimiert. Am Tag sieben fielen die Expressionslevel massiv ab und erreichten für alle Zytokine außer elf Zytokine die Werte des Medians des Analysekollektivs. Am Tag zehn stiegen die Expressionslevel von 32 Zytokinen wieder deutlich an. Am Tag 14 ging das Expressionslevel für alle Zytokine außer sTNF-RI, PDGF-BB, TIMP-2, IL-6 sR und sTNF-RII wieder zurück und erreicht das Niveau der gemessenen Mediane innerhalb des Studienkollektivs (siehe Tabelle 5.11).

ERGEBNISSE

Tabelle 5.16: Zytokinexpressionsmuster des Probanden #20.

Die Werte sind in Prozent, bezogen auf die Positivkontrolle des Testsystems angegeben. Hellgrau dargestellte Werte liegen unter 1 % Messsignal. Farblich hervorgehoben sind Unterschiede des Expressionsmusters im Vergleich zu den Werten des Analysekollektivs (siehe Tabelle 5.11 auf Seite 87). Grün bezeichnet eine mindestens 20 % höhere Expression bei dem Probanden #20, rot eine um mindestens 20 % niedrigere.

Zytokin	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 28
IL-2 ¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IP-10 ^{1,C}	37	2	8	13	0	0	13	0	0
MIG ^{1,C}	9	14	6	21	5	0	13	0	0
TNFβ ¹	46	20	17	21	0	0	21	0	0
IL-3 ^{1,2}	6	0	5	0	0	0	0	0	0
GM-CSF ^{1,2}	38	24	0	40	12	0	32	0	0
IL-4 ²	31	0	3	4	0	0	21	0	0
IL-6 ²	7	0	1	2	0	0	13	0	0
IL-10 ²	32	37	8	41	18	1	20	0	0
IL-13 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eotaxin ^C	8	24	12	9	8	0	22	0	0
Eotaxin-2 ^C	16	40	11	23	14	0	32	0	0
MCP-2 ^C	9	29	10	22	4	0	17	0	0
MIP-1α ^C	0	0	5	15	6	0	9	0	0
IL-1β	0	0	2	0	0	0	0	0	0
IL-7	2	0	0	15	6	0	18	0	0
IL-11	0	0	0	10	5	0	0	0	0
IL-15	0	0	8	2	0	0	0	0	0
IL-16	0	0	1	0	0	0	0	0	0
IL-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TGFβ1	4	13	25	27	13	0	18	0	0
TNFα	17	10	15	17	0	0	15	0	0
G-CSF	15	23	0	31	8	0	33	0	0
M-CSF	9	30	10	26	7	0	19	0	0
sTNF-RI	61	23	14	37	11	4	28	4	3
IFNγ ¹	18	0	7	17	14	2	19	0	0
IL-12p40 ¹	11	0	17	24	32	3	11	2	1
IL-12p70 ¹	0	0	34	27	37	3	23	2	5
IL-1α	0	0	27	36	18	5	14	2	5
PDGF-BB	154	208	11	191	120	25	129	28	27
TIMP-2	200	269	148	231	159	44	181	46	45
sICAM-1	211	199	107	185	137	46	159	36	39
IL-8 ^C	27	29	3	41	14	1	24	0	0
I-309 ^C	0	0	13	28	20	4	13	1	0
MCP-1 ^C	31	27	16	39	10	6	27	3	1
MIP-1β ^C	40	27	42	60	44	4	33	3	2
MIP-1δ ^C	36	9	62	88	75	22	68	21	30
RANTES ^C	123	274	151	189	139	41	160	25	35
IL-6 sR	91	94	66	98	77	56	93	46	46
sTNF-RII	88	70	39	82	45	17	69	14	11

^{1/2} bezeichnet Zytokine die eine T_H1/T_H2-Immunantwort charakterisieren, ^C bezeichnet Chemokine.

Die Zusammenfassung der Daten des zweiten Probanden mit abweichendem Zytokinmuster (#12) sind in Tabelle 5.17 dargestellt. Eine Virämie ließ sich bei ihm nicht feststellen. Gelbfieberspezifische Antikörper ließen sich mit dem IIFT frühestens an Tag 14 nachweisen. Die IgM-Antikörper stiegen von 1:100 auf 1:320 an Tag 28 und fielen daraufhin wieder auf 1:100 ab. IgG-Antikörper ließen sich initial mit einem Titer von 1:32 nachweisen, der daraufhin auf 1:320 anstieg. Im Neutralisationstest war ab Tag zehn ein Titer von 1:50 nachweisbar, der daraufhin bei etwa 1:81 stabil blieb.

Tabelle 5.17: Analyseergebnisse des Probanden #12.

Untersuchung	Tage nach Immunisierung									
	0	1	2	3	4	7	10	14	28	60
GFV-PCR	-	-	neg	neg	neg	neg	neg	-	-	-
IIFT-IgM	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:320	1:100
IIFT-IgG	0	0	0	0	0	0	0	1:32	1:320	1:320
PRNT	0	-	-	-	-	0	1:50	1:82	1:82	1:80

IIFT – indirekter Immunfluoreszenztest, PRNT – Neutralisationstest

Die Abbildung 5.12 zeigt die Auswertung der zellulären Immunparameter für den Probanden #12. Die Konzentrationen sind in Zellen pro Mikroliter Blut für die einzelnen Zellarten dargestellt.

Die Plasmablasten zeigten zwei Einbrüche der Zellzahl von etwa 7 Zellen/ μ L auf 4 Zellen/ μ L an Tag zwei sowie 3 Zellen/ μ L an Tag sieben. Anschließend stieg das Niveau auf etwa 11 Zellen/ μ L. An Tag 28 kam es schließlich wieder zu einem Absinken auf 5 Zellen/ μ L.

Die CD56^{dim} NK-Zellen fielen kontinuierlich bis Tag sieben von 52 Zellen/ μ L auf 32 Zellen/ μ L ab. An Tag zehn kam es zu einem kurzen Anstieg auf etwa 100 Zellen/ μ L. An den folgenden beiden Untersuchungstagen sank die Konzentration wieder auf Werte im Bereich von 40 Zellen/ μ L.

Für die CD56^{bright} NK-Zellen wurde von Tag null bis zu Tag zwei sowie ab dem Tag 14 ein Wert von etwas über 2 Zellen/ μ L gemessen. An den Tagen drei bis sieben fiel der Wert auf unter 2 Zellen/ μ L.

Für die myeloiden dendritischen Zellen konnte ein sehr stabiler Verlauf von etwa einer Zelle/ μ L festgestellt werden, der nur durch einen Anstieg an Tag sieben auf ca. 3 Zellen/ μ L unterbrochen wurde.

Die GFV-spezifischen CD4⁺ T-Helferzellen ließen sich mit einer konstanten Konzentration von 0,25 Zellen/ μ L nachweisen. An den Tagen 3 und 14 kam es zu einem leichten Anstieg der Zellkonzentration im Blut auf 0,42 bzw. 0,54 Zellen/ μ L.

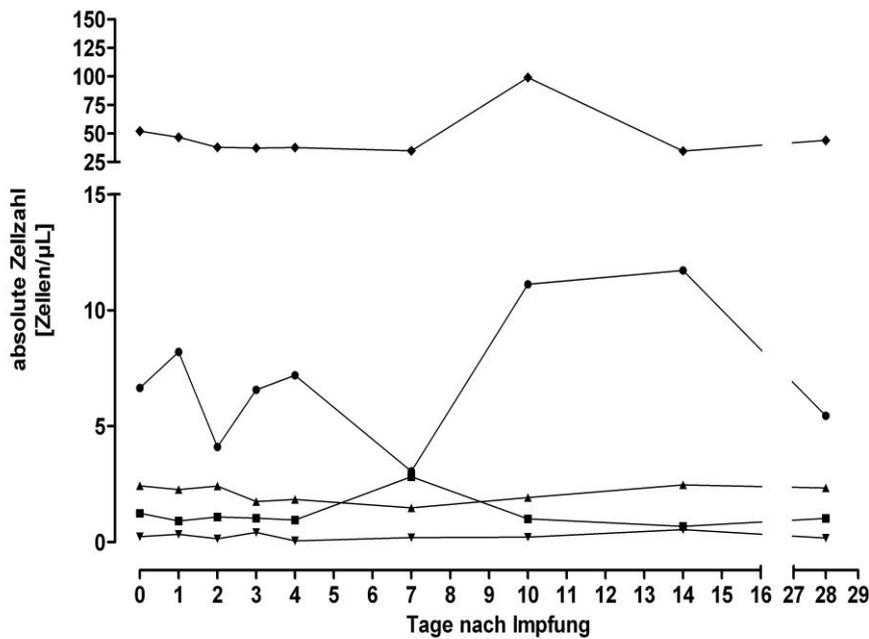


Abbildung 5.12: Zeitlicher Verlauf der Zellkonzentration von Plasmablasten, myeloiden dendritischen Zellen, GFV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen des Probanden #12.
 Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen pro Mikroliter Vollblut für die folgenden Zellpopulationen: (●) Plasmablasten, (■) myeloide dendritische Zellen, (▲) CD56^{bright} NK-Zellen, (◆) CD56^{dim} NK-Zellen und (▼) GFV-spezifische CD4⁺ T-Zellen.

Das Zytokinexpressionsmuster ist in Tabelle 5.18 dargestellt, wobei die Werte die prozentuale Expression bezogen auf die Positivkontrolle wiedergeben. Der Vergleich der Expressionslevel mit dem Analysekollektiv ist farblich markiert. Eine grüne Hinterlegung bezeichnet eine >20 % höhere Expression bei dem Probanden #12, eine rote Hinterlegung eine >20 % niedrigere Expression. Auffällig bei diesem Probanden sind besonders die Tage 7 und 28. Am siebten Tag nach Impfung waren 33 Zytokine nachweisbar exprimiert, an Tag 28 waren es 37 Zytokine. An den anderen Tagen zeigt sich ein sehr uneinheitliches Expressionsmuster der Zytokine. Im Vergleich zum Median der gesamten Studie (Tabelle 5.11 auf Seite 87) ist deutlich erkennbar, dass sehr viele Zytokine, wie z.B. MIG, TNF β , IL-10, MIP-1 α , IL-11, TGF β 1, M-CSF, GM-CSF, PDGF-BB, TIMP-2, IL-8, MIP-1 β , MIP-1 δ , RANTES, IL-6 sR und sTNF-RII deutlich stärker exprimiert wurden als im Analysekollektiv (grün markiert).

ERGEBNISSE

Tabelle 5.18: Zytokinexpressionsmuster des Probanden #12.

Die Werte sind in Prozent, bezogen auf die Positivkontrolle des Testsystems, angegeben. Hellgrau dargestellte Werte liegen unter 1 % Messsignal. Farblich hervorgehoben sind Unterschiede des Expressionsmusters im Vergleich zu den Werten des Analysekollektivs (siehe Tabelle 5.11 auf Seite 87). Grün bezeichnet eine mindestens 20 % höhere Expression bei dem Probanden #20, rot eine um mindestens 20 % niedrigere.

Zytokin	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 28
IL-2 ¹	0	0	0	0	0	18	0	0	4
IP-10 ^{1,C}	0	0	0	11	0	186	2	0	116
MIG ^{1,C}	6	15	16	9	63	120	29	49	159
TNFβ ¹	0	7	3	31	0	289	14	153	240
IL-3 ^{1,2}	0	0	0	0	0	44	0	0	51
GM-CSF ^{1,2}	6	9	0	0	24	23	21	0	80
IL-4 ²	0	0	0	0	0	71	0	0	70
IL-6 ²	0	0	0	0	0	88	0	0	55
IL-10 ²	24	30	31	28	116	227	60	133	252
IL-13 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eotaxin ^C	0	0	0	0	0	268	0	72	188
Eotaxin-2 ^C	0	0	0	0	0	133	0	0	133
MCP-2 ^C	0	0	0	3	0	63	0	0	105
MIP-1α ^C	9	16	22	10	100	47	29	21	81
IL-1β	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-7	0	0	0	0	0	49	0	0	75
IL-11	0	6	6	0	82	0	41	0	14
IL-15	0	1	0	0	0	131	0	103	89
IL-16	0	0	0	0	0	79	0	0	35
IL-17	0	0	0	0	0	32	0	0	0
TGFβ1	0	3	0	24	0	155	0	188	86
TNFα	0	0	0	11	0	127	0	88	82
G-CSF	0	0	0	0	0	40	4	0	73
M-CSF	1	11	0	5	18	84	13	0	124
sTNF-RI	0	0	0	18	0	328	1	153	215
IFNγ ¹	5	10	0	0	63	0	44	0	59
IL-12p40 ¹	10	18	0	0	94	37	37	3	84
IL-12p70 ¹	42	51	0	0	12	4	47	61	172
IL-1α	28	25	0	0	0	0	35	16	106
PDGF-BB	55	53	83	114	159	919	67	725	825
TIMP-2	97	90	164	180	303	847	136	640	706
sICAM-1	21	22	27	18	273	539	137	479	599
IL-8 ^C	9	15	0	11	33	143	20	39	161
I-309 ^C	6	9	0	0	29	0	36	0	32
MCP-1 ^C	0	9	0	21	0	346	8	178	279
MIP-1β ^C	26	31	11	3	137	206	41	179	204
MIP-1δ ^C	62	61	18	0	76	372	59	382	441
RANTES ^C	0	30	45	82	34	603	63	623	564
IL-6 sR	26	25	33	55	56	406	51	238	391
sTNF-RII	12	16	25	59	33	467	32	251	301

^{1/2} bezeichnet Zytokine die eine T_H1/T_H2-Immunantwort charakterisieren, ^C bezeichnet Chemokine.

5.3 Analyse afrikanischer Wildtypinfektionen

Die in der Studie gewonnenen Daten über das Zytokinexpressionsmuster von gesunden Erstimpflingen sollte mit Patienten verglichen werden, die an einer akuten Gelbfieberinfektion leiden. Zu diesem Zweck wurden insgesamt zehn Serumproben aus drei verschiedenen Gelbfiebersausbrüchen in Guinea (2001, 2004 und 2005) untersucht. Im Nachhinein stellte sich heraus, dass die Hintergrunddaten sehr lückenhaft waren, sodass eine klare Aussage über den Zeitraum zwischen Infektion und Probenentnahme nur in einem Fall (#3744) möglich war.

Eine Übersicht über die verfügbaren Daten ist in Tabelle 5.19 gezeigt. Sechs Proben stammten von Frauen, vier von Männern. Das Alter der Patienten reichte von 16 bis 45 Jahren (Median 31 Jahre). In der Vortestung auf gelbfieberspezifische Antikörper waren sieben Patienten positiv für IgM-Antikörper, wobei zwei Patienten gleichzeitig auch positiv für IgG-Antikörper waren. Drei weitere Patienten waren nur für IgG-Antikörper positiv. Von insgesamt vier Patienten gab es Informationen über die Symptomatik (Ikterus und Fieber), die in allen Fällen zu einer Gelbfieberinfektion passen könnten, jedoch nicht sehr spezifisch waren.

Tabelle 5.19: Patientendaten der Wildtypinfektionen.

ID	Alter [Jahren]	Geschlecht	Symptome	Symptombeginn	Probenentnahme	Serologische Vortestung	
						IgM	IgG
3759	18	w	Fieber, Ikterus		25.12.2005	pos	
3744	45	m	Fieber, Ikterus	04.10.2005	15.10.2005	pos	
3686	29	w			28.11.2004	pos	
3755	35	w			17.12.2005	pos	
3754	33	m			17.12.2005	pos	
3637	16	w			14.05.2001	pos	pos
3635	20	w			04.06.2001	pos	pos
3654	27	w	Fieber, Ikterus, Erbrechen				pos
3655	45	m	Fieber, Ikterus, Erbrechen		09.08.2001		pos
3636	38	m			12.06.2001		pos

In Tabelle 5.20 sind die Ergebnisse der Zytokinanalysen dargestellt. Bei einigen Patienten kam es zu Signalen in den Negativkontrollen, die in der Tabelle mit [§] gekennzeichnet sind. Das unspezifische Signal der Negativkontrolle wurde von allen anderen Messwerten abgezogen. Auf Grund der fehlenden zeitlichen Zuordnung der Proben wurden die Zytokinexpressionslevel mit den Werten des Analysekollektivs an Tag zehn verglichen, da zu diesem Zeitpunkt eine hohe Aktivität des Immunsystems in den Probanden nachgewiesen

wurde und außerdem mit Symptomen im Falle eines Impfzwischenfalles zu rechnen ist. Eine grüne Hinterlegung der Daten bezeichnet eine >20 % höhere Expression bei dem afrikanischen Patienten, eine rote Hinterlegung eine >20 % niedrigere Expression. Insgesamt zeigte sich, dass die Expression der Zytokine sich über das gesamte Spektrum deutlich von dem Expressionsmuster der Studie unterschied. Die Expression der Zytokine bei den Patienten ist sowohl bei den Zytokinen, die im Median des Kollektivs nicht exprimiert wurden (IL-2 bis sTNF-RI) als auch in den messbaren Zytokinen des Kollektivs (IFN γ bis sTNF-RII) deutlich höher. Ausnahmen davon bilden IL-7, TIMP-2 und IL-6 sR, die ähnlich stark oder bei einigen Patienten sogar etwas schwächer exprimiert wurden.

Tabelle 5.20: Zytokinexpressionsmuster der Wildtypinfektionen.

Die Werte sind in Prozent, bezogen auf die Positivkontrolle des Testsystems, angegeben. Hellgrau dargestellte Werte liegen unter 1 % Messsignal. Farblich hervorgehoben sind Unterschiede im Expressionsmuster im Vergleich zu den Werten des Impfkollektives (Tabelle 5.11 auf Seite 87). Grün bezeichnet eine >20 % höhere Expression bei den Patienten, rot eine um >20 % niedrigere. ^{1/2} bezeichnet Zytokine die eine T_H1/T_H2-Immunantwort charakterisieren, ^C bezeichnet Chemokine, ^S Daten wurden um den Wert der Negativkontrolle korrigiert.

Zytokin	3759 ^S	3744 ^S	3686 ^S	3755	3754 ^S	3637 ^S	3635 ^S	3654	3655	3636
IL-2 ¹	8	3	11	0	0	6	12	0	0	17
IP-10 ^{1,C}	15	10	9	8	0	0	15	11	16	22
MIG ^{1,C}	5	0	0	13	3	0	7	10	6	12
TNFβ ¹	29	11	7	2	4	0	19	16	16	18
IL-3 ^{1,2}	6	4	12	0	0	1	14	0	0	19
GM-CSF ^{1,2}	29	1	1	15	0	4	1	18	0	0
IL-4 ²	2	6	13	0	0	0	14	1	0	17
IL-6 ²	0	7	7	101	44	0	7	9	0	9
IL-10 ²	23	1	6	18	7	0	6	17	0	15
IL-13 ²	25	6	12	12	0	1	11	13	0	26
Eotaxin ^C	12	6	14	0	6	0	15	1	6	9
Eotaxin-2 ^C	14	9	14	3	3	0	18	5	0	10
MCP-2 ^C	2	0	0	1	3	0	0	2	3	4
MIP-1α ^C	9	0	1	22	14	0	8	11	4	11
IL-1β	17	8	20	28	9	17	17	8	0	23
IL-7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-11	20	0	2	13	0	0	0	12	0	4
IL-15	27	12	15	14	0	0	20	15	14	35
IL-16	21	5	5	0	0	0	12	2	14	22
IL-17	10	0	0	0	0	0	3	0	7	14
TGFβ1	35	17	7	14	4	4	16	30	10	23
TNFα	22	5	1	0	0	0	12	11	7	12
G-CSF	19	1	4	7	0	0	5	6	0	0
M-CSF	0	0	0	5	4	0	0	3	1	5
sTNF-RI	20	5	0	0	1	0	12	14	11	14
IFNγ ¹	31	0	13	13	4	11	11	26	0	10
IL-12p40 ¹	29	0	11	18	1	3	8	19	0	16
IL-12p70 ¹	32	0	16	19	7	12	18	22	6	21
IL-1α	36	2	17	11	10	24	20	18	7	25
PDGF-BB	33	12	17	26	21	0	23	23	33	20
TIMP-2	26	29	19	28	29	6	23	30	41	36
sICAM-1	70	41	41	47	32	34	48	59	44	52
IL-8 ^C	56	97	4	135	115	59	2	73	13	6
I-309 ^C	34	0	13	13	5	16	12	19	0	14
MCP-1 ^C	14	13	2	66	84	0	2	15	9	11
MIP-1β ^C	16	0	5	46	36	0	15	19	12	16
MIP-1δ ^C	42	10	48	35	23	24	41	45	73	39
RANTES ^C	82	74	45	83	58	46	51	88	50	55
IL-6 sR	28	33	28	21	28	5	31	18	24	37
sTNF-RII	29	11	9	11	13	6	29	19	31	30

5.4 Entwicklung einer antiviralen Strategie mittels siRNA-basierter Replikationshemmung

Durch die Einschleusung von siRNA in eukaryotische Zellen lassen sich gezielt bestimmte RNA-Sequenzen spalten und somit unlesbar machen. Dieser Ansatz soll *in vitro* als Möglichkeit zur Unterdrückung der Virusreplikation untersucht werden. In dem gewählten System werden die Zellen mit Plasmiden transfiziert, von denen die siRNA in Form von „hairpin-Molekülen“ konstitutiv exprimiert wird. Diese Vorstufe der siRNA wird durch zelluläre Enzyme umgewandelt und dient anschließend als komplementäre Erkennungssequenz für die Spaltung von RNA-Molekülen, in diesem Fall von RNA-Virusgenomen (siehe 2.2).

5.4.1 Auswahl der gegen das GFV gerichteten siRNA-Sequenzen

Das gesamte 17D-Virusgenom wurde mittels der von der Firma Promega online zur Verfügung gestellten Software „siRNA Target Designer“ [142] auf erfolgversprechende siRNA-Sequenzen untersucht. Diese Sequenzvorschläge wurden daraufhin getestet, ob sie ebenfalls gegen Gene des Menschen oder der Maus gerichtet sind, was einen Ausschlussgrund für die Weiterverwendung darstellte. Die verbleibenden Sequenzen wurden daraufhin untersucht, ob sie auch in anderen Gelbfiebertvirusstämmen vorhanden sind, um ein möglichst breites Wirkungsspektrum zu ermöglichen. Die fünf Sequenzen mit den besten Ergebnissen (siehe Tabelle 5.21) wurden letztendlich für die Versuche ausgewählt. Als Negativkontrolle (siRNA sc) wurde eine siRNA-Sequenz erzeugt, die keine Homologien in dem GFV-, Maus- oder Menschen genom aufwies.

Tabelle 5.21: Übersicht über die verwendeten siRNA-Sequenzen.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Bereich im 17D-Genom [bp]	Virus-Zielprotein	GFV-Stämme mit der Zielsequenz
siRNA#1	GCGTGCAAGCGCACTTATT	1246-1264	E-Protein	17D, 17D-213, 17DD, 17DD-Brasil, Asibi, French neurotropic/viscerotropic virus, Trinidad 79a
siRNA#2	GAATACCGACATTAAGACT	1431-1449	E-Protein	17D, 17DD-Brasil, Asibi, French viscerotropic virus
siRNA#3	GTACATGGACGCAGTCTTT	2955-2973	NS1	17D, 17D-213, 17DD, 17DD-Brasil, Asibi, French neurotropic/viscerotropic virus, Gambia 2001, Ivory Coast 82/99, Trinidad 79a
siRNA#4	GCTGGTCGGGCAAGTAACT	3633-3651	NS2a	17D, 17D-213, 17DD-Brasil, Asibi, French neurotropic/viscerotropic virus, Gambia 2001, Ivory Coast 99, Trinidad 79a
siRNA#5	GAACCGGACTCCACACATT	10508-10526	3'-NTR	17D, 17D-213, 17DD, 17DD, 17DD-Brasil, Asibi, French neurotropic/viscerotropic virus, Gambia 2001, Ivory Coast 82/99, Trinidad 79a
siRNA sc	GCGGTAGCGCCCATATTAT	-	-	-

5.4.2 Herstellung der Expressionsplasmide

Die ausgewählten Sequenzen wurden, wie in Kapitel 4.2.2.8.2 beschrieben, in die Expressionsplasmide inseriert. Zur Kontrolle auf eventuelle Mutationen wurden die erzeugten Plasmide in den inserierten Bereichen sequenziert (4.2.2.7.4). Alle für die Versuche eingesetzten Plasmide wiesen keine Mutationen auf (Daten nicht gezeigt).

SiRNA#4 konnte trotz mehrfachen Versuches nicht hergestellt werden. Die Sequenzen brachen stets zu früh ab, sodass keine Aussage über die Zielsequenz gemacht werden konnte. Sie wurde daher in den Untersuchungen nicht eingesetzt. Durch die erfolgreiche Insertion in das Expressionsplasmid wurden die siRNA-Sequenzen unter die Kontrolle eines humanen U6-Promoters gestellt. U6 „small nuclear“ RNA (U6-snRNA) ist in Zellen am Splicing der mRNA-Moleküle beteiligt und wird daher durch den Promoter konstitutiv transkribiert [154].

5.4.3 Bestimmung der initialen Infektionsdosis

Die Untersuchung der siRNA-Wirkung erstreckte sich über einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden nach Infektion. Daher musste bereits nach 24 Stunden ohne Anwesenheit der siRNAs eine ausreichend hohe Viruslast in den Zellen und dem Überstand entstanden sein, um ein deutlich nachweisbares Signal zu erzeugen. Um zu testen welche Infektionsdosis (MOI) dafür notwendig ist, wurden Hek293T-Zellen entsprechend der Versuchsplanung ausgesät und mit verschiedenen Virusmengen (MOI 0,01 bis 10) infiziert (siehe 4.2.3.4). Nach 24 Stunden wurden die Zellen und der Zellkulturüberstand geerntet und auf die Anzahl der in der TaqMan®-PCR nachweisbaren GÄ untersucht (siehe 4.2.2.7.1). In Tabelle 5.22 sind die Ergebnisse dargestellt. In den Zellen nimmt die Anzahl der GÄ/Ansatz mit steigender MOI von 1015 auf $8,7 \cdot 10^5$ zu. Unter den gleichen Bedingungen steigt die Anzahl der GÄ/Ansatz im Zellkulturüberstand von 101 auf $9,3 \cdot 10^4$ an. Anhand dieser Daten wurde für die nachfolgenden Versuche eine Infektionsdosis von eins verwendet, da sie sowohl Spielraum nach unten für die Reduktionswirkung der siRNAs zulässt als auch den Nachweis der weiteren Replikation der Viren an den folgenden Tagen zulässt.

Tabelle 5.22: Ergebnis der Infektionsversuche mit Infektionsdosen zwischen 0,01 und 10.

Dargestellt sind die Schwellenwertzyklen (C_T) der TaqMan®-PCR und die daraus berechneten GÄ/Ansatz für Zellen und Überstände, die mit verschiedenen Infektionsdosen (MOI) infiziert wurden.

MOI	C_T (Überstand)	GÄ/Ansatz (Überstand)	C_T (Zellen)	GÄ/Ansatz (Zellen)
0,01	32,20	101	28,85	1015
0,1	28,97	955	24,98	$1,8 \cdot 10^4$
1	25,87	9828	22,03	$1,8 \cdot 10^5$
10	22,84	$9,3 \cdot 10^4$	19,77	$8,7 \cdot 10^5$

5.4.4 Optimierung der Transfektionseffizienz

Die Reduktion der Virusreplikation ist von der erfolgreichen Transfektion der siRNA-Expressionsplasmide abhängig. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene chemische Transfektionsreagenzien getestet. Bei Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) und FuGENE® HD (Roche) handelt es sich um Kombinationen aus kationischen Lipiden und nicht geladenen Lipiden. Die ersteren komplexieren durch ihre Ladung die zu transfizierende DNA. Die Beimischung von ungeladenen Lipiden erleichtert das Verschmelzen der DNA-Lipid-Komplexe mit den Zellmembranen. Das Reagenz GeneJuice® (Novagen®) basiert auf nicht toxischen zellulären Proteinen und neuartigen Polyaminen deren Kombination die Bindung der DNA und das Verschmelzen mit der Zellmembran ermöglicht. Lipofectamin™ 2000 der Firma Invitrogen (siehe 4.2.6.4.1) wurde in einem Volumenbereich von 0,25 bis 6 µL je Ansatz mit Plasmidmengen von 0,5 bis 2 µg in verschiedenen Zellarten getestet (siehe Tabelle 5.23). Es zeigte sich, dass nur Hek293T-Zellen in ausreichendem Maße transfizierbar waren. Bei der optimalen Konzentration von 5 µL Lipofectamin™ 2000 mit einem oder zwei Mikrogramm Plasmid wurde eine Transfektionseffizienz von etwa 30 % erreicht, welche durch mikroskopische Auszählung der transfizierten und damit GFP-exprimierenden Zellen bestimmt wurde.

Tabelle 5.23: Transfektionseffizienzen mit Lipofectamin™ 2000.

Gezeigt sind die Transfektionseffizienzen, die durch die Transfektion verschiedener Zelllinien erreicht wurden. Die Transfektionen wurden mit den jeweils angegebenen Volumina Lipofectamin™ 2000 sowie den angegebenen Mengen an Plasmid durchgeführt.

Zellart	Plasmid [µg]	Lipofectamin™ 2000 [µL]							
		0,25	0,5	1	2	3	4	5	6
Hek293T	1	-	-	-	-	+	++	+++	++
	2	-	-	-	-	+	+++	+++	++
Hek293 Graham	1	-	-	-	-	-	-	-	-
HeLa	1	-	-	-	-	-	+	+	-
PS	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-

Effizienzen: - < 10 %, + = 10 %, ++ = 20 %, +++ = 30 %

Das von Roche hergestellte FuGENE® HD (siehe 4.2.6.4.2) wurde in Ansätzen zu 5, 7 und 9 µL mit 2 oder 3 Mikrogramm Plasmid eingesetzt. Von diesen Komplexen wurden jeweils 40 oder 60 µL auf die Zellen gegeben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.24 zusammengefasst. Die optimalen Kombinationen erreichten eine Transfektionseffizienz von etwa 20 %.

Tabelle 5.24: Transfektionseffizienzen mit FuGENE® HD.

Gezeigt sind die Transfektionseffizienzen, die durch die Transfektion mit den jeweils angegebenen Volumina FuGENE® HD sowie den angegebenen Mengen an Plasmid erreicht wurden. Von den jeweiligen Komplexgemischen wurden die angezeigten Volumina auf die Hek293T-Zellen gegeben.

Zellart	Plasmid [µg]	FuGENE® HD [µL] / Volumen Komplex [µL]					
		5 / 40	5 / 60	7 / 40	7 / 60	9 / 40	9 / 60
Hek293T	2			+	++		
	3	-	-	+	++	++	+

Effizienzen: - < 10 %, + = 10 %, ++ = 20 %

Als drittes Reagenz wurde GeneJuice® der Firma Novagen® eingesetzt (siehe 4.2.6.4.3). Es wurden Kombinationen von 0,75 bis 3 µL Reagenz mit 0,5 bis 1,5 µg Plasmid ausgetestet, wie in Tabelle 5.25 gezeigt. Mit dieser Transfektionsreagenz konnten maximal 10 % Effizienz erreicht werden.

Tabelle 5.25: Transfektionseffizienzen mit GeneJuice®.

Gezeigt sind die Transfektionseffizienzen, die durch die Transfektion mit den jeweils angegebenen Volumina GeneJuice® sowie den angegebenen Mengen an Plasmid in Hek293T-Zellen erreicht wurden.

Zellart	Plasmid [µg]	GeneJuice® [µL]		
		0,75	1,5	3
Hek293T	0,5	+	+	-
	1	-	+	+
	1,5	-	+	+

Effizienzen: - < 10 %, + = 10 %

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Versuche zur Wirkung der siRNAs mit Hek293T Zellen durchgeführt, die mit 5 µL Lipofectamin™ 2000 und 1 µg Plasmid transfiziert wurden.

5.4.5 Wirksamkeitsuntersuchung der siRNAs

Die Replikationshemmung der siRNAs wurde im Vergleich mit der Replikation in der Negativkontrolle, die mit der nicht-GFV-spezifischen siRNA transfiziert wurde, durch zwei Verfahren bestimmt. Zum einen wurden die Virusgenomäquivalente mittels TaqMan®-PCR nachgewiesen (4.2.2.7.1). Zum anderen wurden die neu produzierten infektiösen Partikel sowohl in den Zellen als auch im Überstand durch den Plaque-Test (4.2.3.1.1) bestimmt.

Um unterschiedliche Zellzahlen in den einzelnen Ansätzen zu berücksichtigen, wurden alle Werte über das Tubulin-Gen (siehe Abschnitt 4.2.2.7.3) auf die Zellzahl je Ansatz normalisiert [144].

5.4.5.1 Inhibition der Replikation des 17D-Gelbfieberimpfstammes durch die siRNAs

Zunächst wurde für die Experimente der Gelbfieberimpfstamm 17D verwendet, weil dieser das Arbeiten unter S2-Bedingungen erlaubt.

Um die Replikationshemmung nachzuweisen wurden in jedem Experiment die Werte für die Negativkontrolle (unspezifische siRNA) als 100 % definiert und die Daten der anderen siRNAs darauf bezogen. In der folgenden Abbildung 5.13 sind die Ergebnisse der PCR-Quantifizierung zusammengefasst dargestellt. Für jeden Untersuchungszeitpunkt wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen für die Genomäquivalente berechnet. Mittels des T-Tests wurde jeweils geprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und dem jeweiligen Messwert für die siRNA bestand. Bei diesem Test wird die Differenz zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen daraufhin untersucht, ob die Unterschiede zufällig aus der Streuung der Daten heraus entstanden sind oder ob ein bedeutsamer Unterschied besteht. Die Signifikanzaussagen sind in der folgenden Abbildung 5.13 wie folgt markiert: * bedeutet $p < 0,05$, ** bedeutet $p < 0,01$. Eine Grundvoraussetzung für die Aussagekraft des T-Tests ist die Homogenität der Varianz der beiden Vergleichsgruppen. Parallel zu den T-Testen wurde daher der Levene-Test durchgeführt, der diese Varianzhomogenität überprüft. Es kommt daher in Einzelfällen dazu, dass beispielsweise die Mittelwerte zweier siRNAs den gleichen (im T-Test signifikanten) Unterschied zu der Negativkontrolle aufweisen, jedoch eine der beiden auf Grund der fehlenden Varianzhomogenität und damit der fehlenden Aussagekraft des T-Tests als nicht signifikant eingestuft werden muss.

Auf der Genomebene zeigt die siRNA#1 eine sehr einheitliche Reduktion der Virusgenomäquivalente. Über den gesamten Versuchszeitraum waren sowohl in den Zellen wie auch im Überstand der mit siRNA#1 transfizierten Zellen eine hochsignifikante Reduktion auf 30-40 % nachweisbar.

Ein ähnliches Verhalten zeigte siRNA#3. Auch hier konnte bereits nach 24 Stunden eine Reduktion der Genomäquivalente nachgewiesen werden, diese lag im Überstand bei 45 % ($p < 0,01$) und in den Zellen bei 65 % ($p < 0,05$) und damit etwas höher als siRNA#1. An den darauffolgenden Tagen wurde die Anzahl der Genomäquivalente auf Bereiche um 20-30 % ($p < 0,01$) der Negativkontrolle gesenkt.

SiRNA#5 zeigt 24 Stunden nach Infektion nur in den Zellen eine signifikante Reduktion der Genomäquivalente auf 40 % ($p < 0,01$). Am zweiten Tag nach Infektion sank das Nachweislevel sowohl für Zellen wie auch für den Überstand auf etwa 30 % ($p < 0,01$) und stieg 72 Stunden nach Infektion wieder auf 50 % an, blieb jedoch signifikant. SiRNA#2 zeigte

ein deutlich abweichendes Muster. Sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Infektion konnte keine Reduktion der Genomäquivalente festgestellt werden. Am zweiten Tag wurde eine signifikante Erhöhung der Genomäquivalente in den Zellen auf 226 % ($p < 0,05$) nachgewiesen. Nach 72 Stunden konnte eine Reduktion in den Zellen und dem Überstand auf Bereiche um 50 % gezeigt werden.

In der folgenden Abbildung 5.14 sind die nachweisbaren infektiösen Partikel unter der Anwesenheit der verschiedenen siRNAs dargestellt. Die Anzahl der infektiösen Partikel in den Negativkontrollen wurde mit 100 % angesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Eine statistische Analyse war in diesem Fall nicht möglich, da lediglich eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Bestimmung der GÄ (Abbildung 5.13) konnte für die siRNAs#1, #3 und #5 keine Reduktion der Replikation nach 24 Stunden festgestellt werden. Die Werte für den Überstand und die Zellen blieben auf dem Niveau der Negativkontrolle. Für siRNA#1 konnte an den folgenden beiden Tagen eine deutliche Reduktion auf 25 bzw. 40 % nachgewiesen werden. Für siRNA#3 wurde eine kontinuierliche Abnahme der Werte auf etwa 45 % nach 48 Stunden und 20 % nach 72 Stunden gemessen. Die Replikation des Virus wurde unter Anwesenheit von siRNA#5 nach 48 Stunden auf etwa 50 % gesenkt. Nach 72 Stunden blieb der Messwert für die Zellen weiterhin bei 50 %, der für den Zellkulturüberstand stieg auf etwa 100 % an.

SiRNA#2 zeigte, wie auch bei der PCR-Analyse, eine starke Abweichung der Wirkung. 24 Stunden nach der Infektion wurden sowohl für die Zellen als auch für den Überstand Werte um 245 % nachgewiesen. Am zweiten Tag nach Infektion sanken die Werte, erreichten jedoch keine Reduktion im Vergleich zu der Negativkontrolle. Erst am dritten Tag wurde eine Reduktion auf etwa 44 % nachgewiesen.

Bis auf die Tatsache, dass im Plaque-Test keine Reduktion am ersten Tag nachweisbar war, decken sich die Werte beider Versuche sehr gut. Die siRNAs #1 und #3 zeigten nach 48 bzw. 72 Stunden eine deutlich reduzierte Replikation. SiRNA#5 zeigte den gleichen Effekt, jedoch nicht so stark ausgeprägt wie die beiden vorgenannten. SiRNA#2 wich von den übrigen siRNAs in der Weise ab, dass sie erst nach 72 Stunden eine leichte Reduktion bewirkt, in der Zeit davor jedoch teilweise sogar eine Verbesserung der Replikation verursachte.

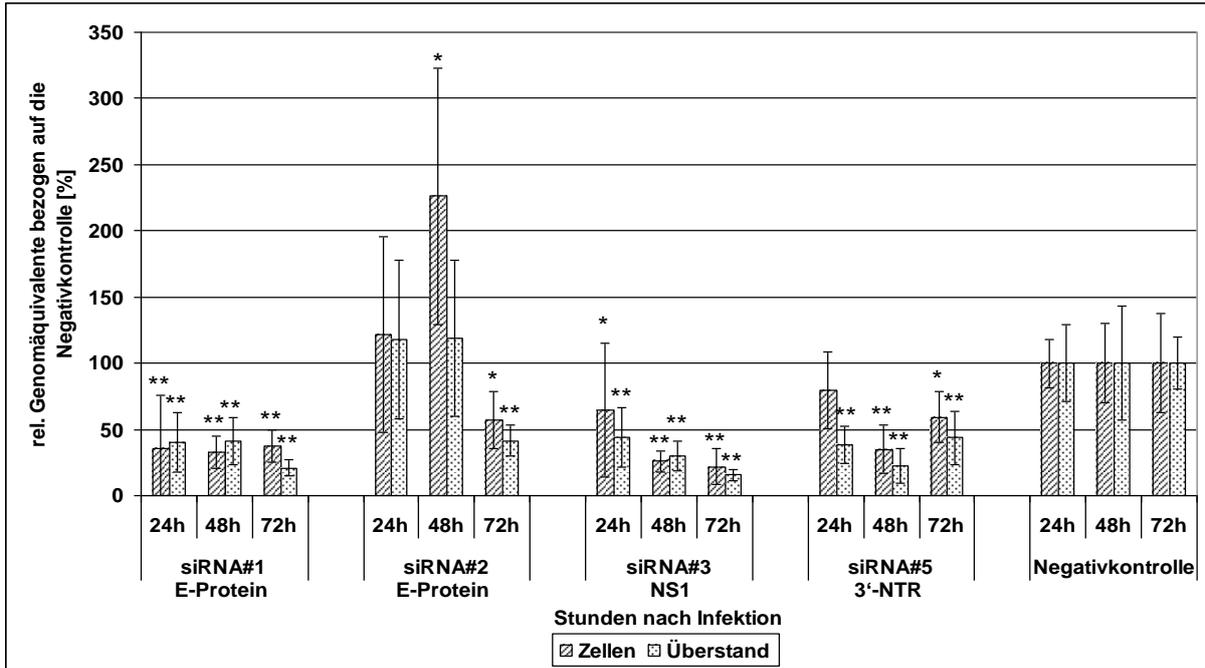


Abbildung 5.13: Relative 17D-Virusreplikation auf Genomäquivalentenebene.

Dargestellt werden die Mittelwerte der prozentualen Verhältnisse der nachgewiesenen Genomäquivalente zwischen den einzelnen Ansätzen und der Negativkontrolle. Die Mittelwerte der Negativkontrollen wurden als 100 % definiert, alle anderen Werte wurden darauf bezogen. Für jede siRNA wurden jeweils die Werte der Zellen sowie des Überstandes für die Zeitpunkte 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion bestimmt. Angegeben sind außerdem die Zielbereiche der siRNAs innerhalb des *GFV*-Genoms. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Daten dar. * bezeichnet signifikante Daten mit $p < 0,05$, ** mit $p < 0,01$ im T-Test.

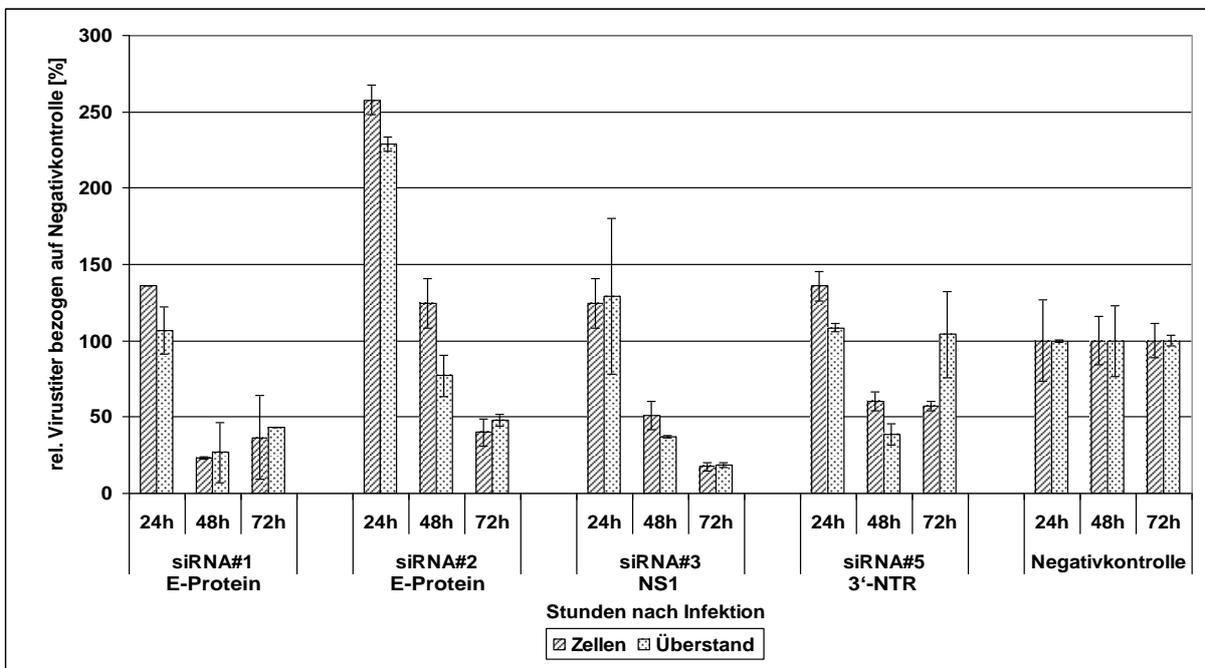


Abbildung 5.14: Nachweis der infektiösen 17D-Viruspartikel im Plaque-Test.

Dargestellt werden die Mittelwerte der prozentualen Verhältnisse der nachgewiesenen Virustiter zwischen den einzelnen Ansätzen und der Negativkontrolle. Die Mittelwerte der Negativkontrollen wurden als 100 % definiert, alle anderen Werte wurden darauf bezogen. Für jede siRNA wurden jeweils die Werte der Zellen sowie des Überstandes für die Zeitpunkte 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion bestimmt. Angegeben sind außerdem die Zielbereiche der siRNAs innerhalb des *GFV*-Genoms. Die Fehlerbalken stellen die Mittelabweichung der Daten dar.

5.4.5.2 Wirkung der siRNAs auf den GFV Asibi-Wildtypstamm

Um die Wirkung der siRNAs *in vitro* auch gegen eine Infektion mit dem Asibi-Wildtypstamm zu zeigen, wurden die gleichen Experimente wie unter 5.4.5.1 beschrieben erneut durchgeführt.

Die Abbildung 5.15 zeigt die Ergebnisse der Reduktionswirkung auf Ebene der Genomäquivalente. Gezeigt werden die relativen Mittelwerte der einzelnen siRNAs für Zellen und Überstand jeweils bezogen auf die Negativkontrolle, die als 100 % definiert wurde. Die Signifikanzaussagen wurden über den T-Test berechnet und sind mit * ($p < 0,05$) bzw. ** ($p < 0,01$) gekennzeichnet.

Die Anwesenheit der siRNA#1 in den Zellen senkte den Anteil an Genomäquivalenten signifikant auf etwa 30-40 % über den gesamten Messzeitraum, abgesehen von dem Messwert der Zellen nach 24 Stunden bei dem keine signifikante Reduktion nachgewiesen wurde.

Für siRNA#3 wurden nach 24 Stunden Werte um 50 % nachgewiesen, wobei nur der Wert für den Überstand auch als signifikant bestätigt wurde. Danach fielen die Werte auf etwa 10 % ($p < 0,01$) der Negativkontrolle. Der p-Wert für den Überstand-Messwert nach 72 Stunden zeigte auf Grund einer nicht homogenen Varianz der Gruppe (Levene-Test: $p < 0,05$) keine Signifikanz.

SiRNA#5 zeigte nach 24 und 72 Stunden eine Reduktion der Werte auf etwa 20-25 % ($p < 0,01$), wobei wiederum der Messwert für den Überstand nach 72 Stunden auf Grund der fehlenden Varianzhomogenität der Gruppe nicht signifikant war. 48 Stunden nach der Infektion lagen die Werte mit etwa 48 % ($p < 0,01$) höher als an den beiden anderen Tagen.

Wie bereits bei den Ergebnissen für den 17D-Impfstamm gezeigt, wich die Wirkung der siRNA#2 auch beim Wildtypstamm von den anderen ab. Es wurden deutlich unterschiedliche Messwerte für Zellen und Überstand an den Messzeitpunkten bestimmt. In den Zellen wurde nach 24 und 48 Stunden keine Reduktion festgestellt. Nach 72 Stunden ließ sich jedoch ein signifikanter Wert von 42 % ($p < 0,05$) belegen. Für die Überstände wurden nach 24 bzw. 48 Stunden Messwerte um 65 % nachgewiesen, wobei nur der 24 Stunden Messwert signifikant war. Nach 72 Stunden stieg der Messwert auf 95 % an.

Die Analyse der produzierten infektiösen Partikel (Abbildung 5.16) ergab folgende Resultate. SiRNA#1 senkte die Replikation während des Untersuchungszeitraums auf etwa 25 % der Negativkontrolle, wobei der Wert des Zellkulturüberstandes nach 24 Stunden von allen anderen Werten stark mit 69 % abwich.

Die Anwesenheit der siRNA#3 reduzierte die Werte nach 24 Stunden in den Zellen auf 42 % und im Überstand auf 84 %. Nach 48 und 72 Stunden wurde die Replikation auf etwa 6 % sowohl für die Zellen als auch den Überstand gesenkt.

SiRNA#5 senkte bereits nach 24 Stunden die Replikation auf etwa 31 %. Dieser Wert blieb für den Zellkulturüberstand auch nach 48 Stunden erhalten, der Anteil der infektiösen Partikel in den Zellen stieg auf 86 % an. Nach 72 Stunden fielen die Messwerte für Zellen und Überstand auf 11 %.

Die Virusreplikation in den Zellen unter dem Einfluss von siRNA#2 wurde nach 72 Stunden erstmals auf einen Wert von 64 % gesenkt. Die Reduktion im Überstand begann nach 48 Stunden mit 32 % und fiel nach 72 Stunden weiter auf 7 %.

Insgesamt betrachtet zeigte sich im Vergleich zu den Messwerten des 17D-Stammes, dass die Wirkungen der einzelnen siRNAs auf die beiden Stämme vergleichbar sind. Die siRNAs #1 und #3 zeigten eine sehr gute Replikationshemmung, siRNA#5 wirkte ebenfalls deutlich, wenn auch nicht so stark. SiRNA#2 zeigt auch bei diesen Experimenten deutliche Wirkungsunterschiede innerhalb des untersuchten Zeitraumes.

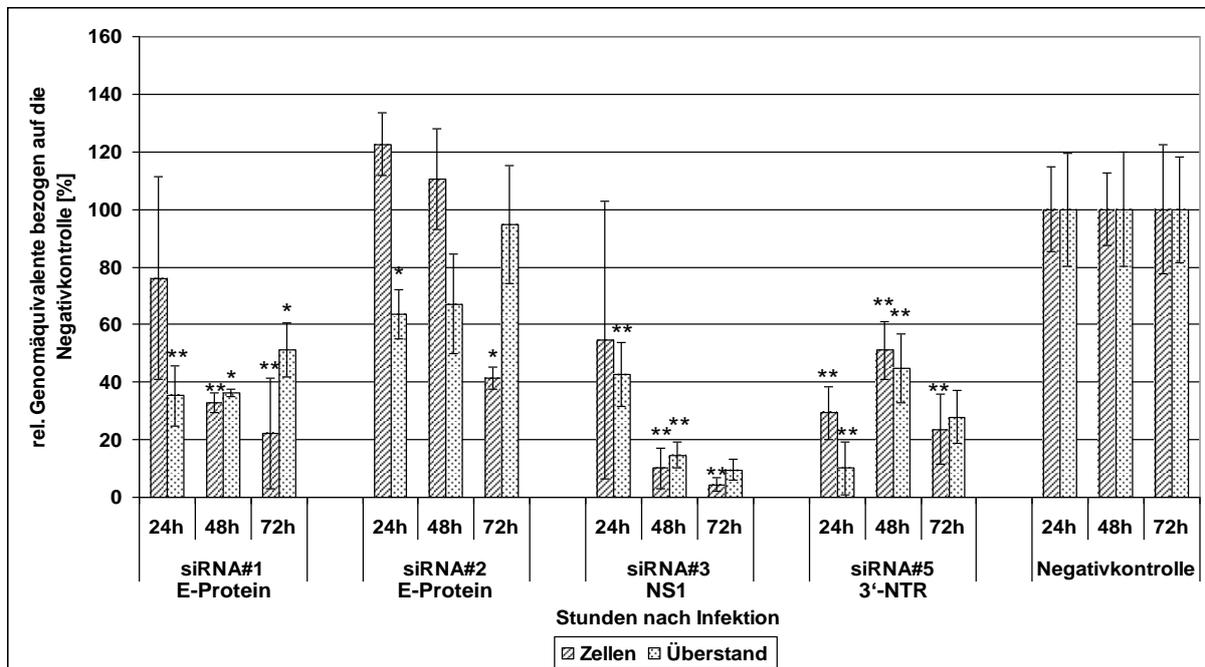


Abbildung 5.15: Relative Asibi-Virusreplikation auf Genomäquivalentebene.

Dargestellt werden die Mittelwerte der prozentualen Verhältnisse der nachgewiesenen Genomäquivalente zwischen den einzelnen Ansätzen und der Negativkontrolle. Die Mittelwerte der Negativkontrollen wurden als 100 % definiert, alle anderen Werte wurden darauf bezogen. Für jede siRNA wurden jeweils die Werte der Zellen sowie des Überstandes für die Zeitpunkte 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion bestimmt. Angegeben sind außerdem die Zielbereiche der siRNAs innerhalb des *GFV*-Genoms. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Daten dar. * bezeichnet signifikante Daten mit $p < 0,05$, ** mit $p < 0,01$ im T-Test.

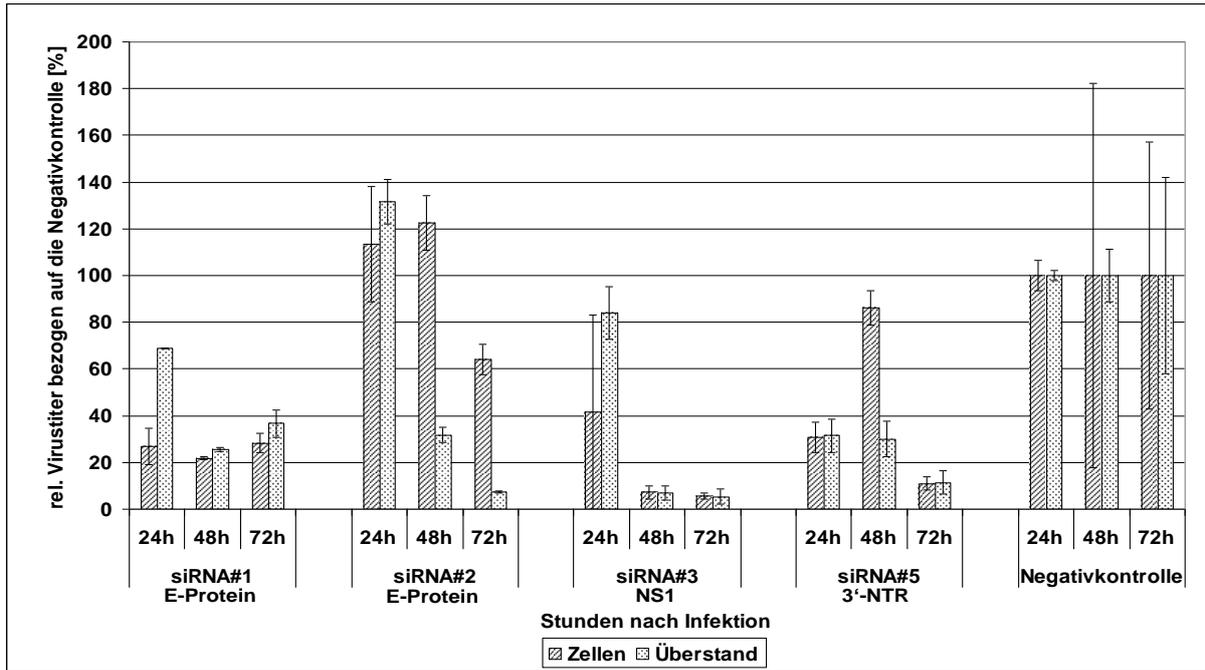


Abbildung 5.16: Nachweis der infektiösen Asibi-Viruspartikel im Plaque-Test.

Dargestellt werden die Mittelwerte der prozentualen Verhältnisse der nachgewiesenen Virustiter zwischen den einzelnen Ansätzen und der Negativkontrolle. Die Mittelwerte der Negativkontrollen wurden als 100 % definiert, alle anderen Werte wurden darauf bezogen. Für jede siRNA wurden jeweils die Werte der Zellen sowie des Überstandes für die Zeitpunkte 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion bestimmt. Angegeben sind außerdem die Zielbereiche der siRNAs innerhalb des *GFV*-Genoms. Die Fehlerbalken stellen die Mittelabweichung der Daten dar.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Immunantwort nach erstmaliger GF-Impfung untersucht. Entscheidend dabei war das Ziel, einen möglichst umfassenden Überblick über die humoralen und gleichzeitig die zellulären Abläufe zu erhalten. Des Weiteren wurde durch die umfangreiche Analyse der Zytokine die Kommunikation innerhalb der immunologischen Reaktionen beobachtet. Ein Grund für die Notwendigkeit dieser Untersuchungen sind die immer wieder auftretenden schweren Impfwischenfälle, deren Ursachen größtenteils unbekannt sind. Aus drei Massenimpfkampagnen in Togo, Mali und Sierra Leone wurden Proben der aufgetretenen Verdachtsfälle von Impfwischenfällen untersucht. Sowohl bei Impfwischenfällen als auch bei Wildtypinfektionen besteht das Problem, dass sie nur symptomatisch behandelt werden können, da eine virusspezifische Therapie fehlt. Auf Zellkulturebene wurden daher Experimente durchgeführt, die eine inhibitorische Wirkung von gelbfieberspezifischen siRNAs auf die Replikation des Impfvirus und des Asibi-Wildtypvirus zeigen sollen.

6.1 Analyse von schweren GF-Impfwischenfällen

Von drei GF-Massenimpfungen wurden Proben der Verdachtsfälle von schweren Impfwischenfällen an das Robert Koch-Institut (RKI) zur Untersuchung gesandt, wobei sich schnell ein grundsätzliches Problem der Daten- und Probenübermittlung zeigte: Die Probenverpackung und -beschriftung war häufig unzureichend, was zu einer möglichen Kreuzkontamination der Proben geführt haben könnte. Ebenfalls problematisch war, dass die Kühlmaßnahmen für längere Transporte nicht geeignet waren und die Proben in allen Fällen ungekühlt eintrafen. Häufig wurden nur sehr unvollständige Daten zum Hintergrund der Erkrankung mitgeschickt, sodass eine umfassende Beurteilung nicht möglich war.

Alle Angaben über Antikörper-Titer im folgenden Text beziehen sich stets auf den Nachweis von gelbfieberspezifischen Antikörpern, auch wenn dies nicht explizit angegeben ist.

Von den 16 Proben aus Togo (siehe Abschnitt 5.1.2 auf Seite 69) wurden neun symptomatisch (Enzephalitis, Meningitis, Gesichtslähmung, Kopfschmerzen) als neurologische Verdachtsfälle (YEL-AND) eingestuft, wobei eine eindeutige Identifizierung durch einen Antikörpernachweis in der Rückenmarksflüssigkeit (CSF) nicht möglich war, weil das entsprechende Probenmaterial nicht zur Verfügung gestellt wurde. Drei Patienten wurden mit viscerotropen Symptomen (Ikterus, Fieber) als YEL-AVD-Verdachtsfälle eingestuft. Vier weitere schwere Verdachtsfälle wiesen als Leitsymptome Ödeme oder eine

Hauterkrankung (Steven-Johnson Syndrom) auf, was nicht in die Einteilung YEL-AVD/-AND passte.

Von diesen 16 Patienten konnten bei insgesamt sechs weder IgG- noch IgM-Antikörper nachgewiesen werden, sodass eine Beteiligung des *GFV* an den Symptomen eher als unwahrscheinlich einzustufen war. Für einen Patienten konnte diese Einschätzung bestätigt werden, da im Rekonvaleszenzserum 115 Tage nach der Impfung ein Neutralisationstiter (PRNT-Titer) von 1:21 nachgewiesen wurde. Dies ist selbst für eine normalverlaufende Impfung ein geringer Titer (siehe Tabelle 5.9 auf Seite 84) und widerspricht der Tatsache, dass gerade bei Impfwischenfällen in der Regel sehr hohe Titer nachweisbar sind [83, 155, 156].

Bei drei der 16 Patienten wurden Antikörper der Klasse IgG nachgewiesen, sodass eine akute *GFV*-Infektion nicht bestätigt werden konnte. In diesen Fällen liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine bereits bestehende Immunität gegen das *GFV* oder ein verwandtes *Flavivirus* handelt [157-159]. Togo gehört nach Einschätzung der WHO zu den 12 Ländern mit dem höchsten GF-Risiko [27], sodass eine bereits durchgemachte *GFV*-Infektion sehr wahrscheinlich ist.

Im Serum von fünf Patienten konnten sowohl IgM- als auch IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Bei drei dieser Patienten wurden im Rekonvaleszenzserum nur niedrige PRNT-Titer nachgewiesen, weswegen diese Patienten als unwahrscheinliche Impfwischenfälle eingestuft wurden. Bei den verbleibenden zwei Patienten mit nachweisbaren IgG- und IgM-Antikörpern ist ein Zusammenhang der Symptomatik mit der GF-Impfung möglich. Einer der Patienten wurde daher als möglicher YEL-AND eingestuft. Der zweite Patient passte den Symptomen nach nicht in die Einteilung YEL-AVD/-AND und wurde daher gesondert registriert.

Bei zwei Patienten ließen sich nur IgM-Antikörper nachweisen, wobei eine zeitliche Einordnung der Probenentnahme nicht möglich war. Ein Patient wies einen AK-Titer von 1:100 auf, was abhängig von der vergangenen Zeit nach Impfung ein normaler Wert sein kann (Tabelle 5.7 auf Seite 81 und [55]) oder bei sehr frühem Auftreten ein Indiz für einen Impfwischenfall ist. Der Patient wurde daher als möglicher viscerotroper Impfwischenfall eingestuft. Bei dem zweiten IgM-positiven Patienten wurde ein AK-Titer von 1:500 nachgewiesen, was auf eine massive Immunantwort hinweist, wie sie auch bei anderen Impfwischenfällen gezeigt wurde [160]. Dieser Patient wurde daher als wahrscheinlicher YEL-AVD Impfwischenfall eingestuft.

Bezogen auf die Impfung von 3,6 Millionen Menschen in Togo ergaben die beiden als möglich oder wahrscheinlich eingestuften viscerotropen Zwischenfälle eine Rate von

1:1.800.000, die unterhalb der erwarteten Wahrscheinlichkeit von 1:200.000-300.000 [82] liegt. Anhand der vorliegenden Daten wurde ein möglicher YEL-AND registriert, was einer Wahrscheinlichkeit von 1:3.600.000 ergab und damit ebenfalls weit unter dem allgemeingültigen Wert von 1:150.000-250.000 liegt.

Im Jahr 2008 wurden in Mali rund sechs Millionen Menschen gegen GF geimpft. Insgesamt wurden von sieben Patienten Proben eingeschickt (siehe Kapitel 5.1.3 auf Seite 72), wobei in keiner der Nachweis des *GFV* mittels TaqMan[®]-PCR oder Virusanzucht gelang. Eine sichere Aussage ließ sich auf Grund der schlechten Transportbedingungen daraus nicht ableiten, da die Kühlung während des Transportes unzureichend war. Dies könnte dazu geführt haben, dass vorhandene Viren zerstört wurden und so ein Nachweis nicht möglich war [161]. Zwei Patienten wiesen neurologische Symptome (Krämpfe, Gesichtslähmung) und vier Patienten viscerale Symptome (Ikterus bzw. Blutungen) auf.

Ein Patient litt 30 Minuten nach der Impfung an Durchfall und Tachykardie. Auf Grund des zeitlichen Abstandes zwischen Impfung und Symptombeginn ist von einem anaphylaktischen Schock auszugehen, der erwartungsgemäß sofort nach der Impfung einsetzt. Solche Reaktionen, die hauptsächlich bei Personen mit Allergien gegen Hühnereiweiß oder Gelatine auftreten, sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:131.000 zu erwarten [82]. Dieser Patient wurde aus diesem Grund nicht als Impfwischenfall nach den Kategorien YEL-AVD/-AND gewertet.

Drei Patienten zeigten einen Ikterus, der durch eine massive Schädigung der Leber verursacht wurde. Alle wiesen zum Zeitpunkt der Probenentnahme jedoch eine klinisch bestätigte akute Hepatitis-B-Infektion auf, die sehr wahrscheinlich für die Symptome verantwortlich war. Bestätigt wurde diese Einschätzung durch den ausschließlichen Nachweis von IgG-Antikörpern in zwei Fällen bzw. den nachgewiesenen niedrigen PRNT-Titer im Rekonvaleszenzserum der dritten Person. Die Patientin mit Blutungen wies an Tag neun ebenfalls nur IgG-Antikörper auf, sodass auch sie als unwahrscheinlicher Impfwischenfall eingestuft wurde. Die beiden neurotrophen Verdachtsfälle wiesen im CSF keine Antikörper auf. Dieses wichtige diagnostische Merkmal in Verbindung mit der Tatsache, dass in einem Fall nur IgG-Antikörper im Serum und in dem anderen Fall normale AK-Titerwerte an Tag 15 nachgewiesen wurden, führte zu der Einstufung als unwahrscheinliche Impfwischenfälle.

Die Expertenkommission zur Beurteilung der Verdachtsfälle kam in Bezug auf einen der beiden neurotrophen Verdachtsfälle (Patient #063) zu dem Ergebnis, dass es sich um einen

Impfzwischenfall handelte. Es konnte nicht festgestellt werden, ob die Grundlage dieser Entscheidung auf noch weiteren Informationen oder Probenanalysen beruhte.

Bezogen auf die geimpften Personen lag das Risiko eines neurotrophen Impfzwischenfalls somit bei 1:5,87 Millionen. Ein bestätigter viscerotroper Impfzwischenfall wurde nicht gemeldet.

Von der 2009 in Sierra Leone durchgeführten Impfkampagne wurden Proben von drei Patienten an das RKI gesandt (siehe Abschnitt 5.1.4 auf Seite 75), von denen zwei verstorben waren. Der Nachweis von viraler RNA sowie von Antikörpern der Klasse IgM fiel bei allen Proben negativ aus. Auf Grund der Tatsache, dass der Nachweis viraler RNA bei allen darauf untersuchten Proben fehl schlug, legt die Vermutung nahe, dass dies auf die unzureichende Transportkühlung zurückzuführen ist.

Eine Patientin ist acht Tage nach der Impfung mit Fieber und abdominalen Schmerzen in ein Krankenhaus eingeliefert worden und dort verstorben. Es konnten nur an Tag acht IgG-Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Zusammen mit dem nicht aussagekräftigen Nachweis viraler RNA in den untersuchten Organproben ist auf Basis dieser Daten kein eindeutiger Zusammenhang mit der Impfung herzustellen. Zwei Patientinnen litten nach der Impfung an neurologischen Symptomen. Bei einer Patientin wiesen die bestimmten IgG-Antikörpertiter nicht auf eine anormale Immunreaktion hin, daher ist von einer Koinzidenz dieser Ereignisse auszugehen. Die zweite Patientin, die zwei Wochen nach der Impfung verstorben ist, wies am sechsten Tag außerordentlich hohe Serum IgG-Titer (1:3.200) sowie einen nachweisbaren Antikörpertiter im CSF auf. Die Symptomatik und die diagnostischen Parameter bestätigen einen neurotrophen Impfzwischenfall mit tödlichem Ausgang.

Für diesen neurotrophen Impfzwischenfall ergab sich eine Wahrscheinlichkeit von 1:3,98 Millionen.

In den drei untersuchten Massenimpfungen wurden von insgesamt 26 Verdachtsfällen sechs als möglich, wahrscheinlich oder bestätigt eingestuft. Die Inzidenz des Auftretens lag jedoch deutlich unter den Vorhersagen aus anderen Untersuchungen. Ein möglicher Grund dafür, besonders bei Impfkampagnen in abgelegenen Regionen, ist die unzureichende Meldung der Verdachtsfälle [90, 162]. Besonders die lediglich drei gemeldeten Verdachtsfälle bei fast 4 Millionen Impfungen in Sierra Leone lassen die Vermutung aufkommen, dass entweder die Meldung der Fälle unzureichend war oder nicht alle Fälle an das RKI gesandt wurden. Eine umfassende Überwachung erfordert u.a. die Schulung des medizinischen Personals, die

Information der lokalen und übergeordneten Gesundheitszentren, den Aufbau eines Berichtsystems, die zentrale Auswertung aller eingehender Meldungen sowie die klinische Untersuchung der Verdachtsfälle [89, 90, 163]. Im Rahmen großer Kampagnen sind diese Anforderungen nur schwer flächendeckend umzusetzen. Es muss damit gerechnet werden, dass behandlungsbedürftige Fälle nicht an die entsprechenden Stellen weitergeleitet und somit nicht erfasst werden. Um diese Problematik in Zukunft zu reduzieren, wurde kürzlich von der WHO in Zusammenarbeit mit dem RKI und weiteren beteiligten Untersuchungslaboratorien eine neue Richtlinie für die Überwachung von Impfwischenfällen nach GF-Impfungen herausgegeben: „Surveillance of adverse events following immunization against yellow fever“ [89].

Ein weiterer nicht zu quantifizierender Faktor ist die Seroprävalenz in den entsprechenden Regionen. Da Impfkampagnen gezielt in Hochrisikogebieten durchgeführt werden, ist damit zu rechnen, dass viele Menschen bereits Antikörper gegen das *GFV* aufweisen. Schwere Impfkomplicationen konnten bis auf einen Fall nur in Erstimpfungen nachgewiesen werden [14], sodass eine erhöhte Seroprävalenz die Wahrscheinlichkeit von schweren Nebenwirkungen senkt.

Ein weiteres Problem zeigte sich bei dem Patienten #063 aus Mali. Auf Grund der vorliegenden Datenlage wurde der Patient als unwahrscheinlicher Impfwischenfall gewertet. Die Expertenkommission kam jedoch zu dem Schluss, dass ein neurotroper Impfwischenfall vorlag. Es ist daher nicht auszuschließen, dass andere Fälle durch weitere Untersuchungen als Impfwischenfälle eingestuft werden müssten und somit die Anzahl steigen würde. Durch die Herausgabe von klaren Richtlinien für die Durchführung und Überwachung von Impfkampagnen [89] wird die Informationsgewinnung und -weitergabe standardisiert, Empfehlungen für den Versand von Probenmaterial gegeben und somit das Problem in Zukunft verringert. Des Weiteren werden zunehmend Transportmethoden eingesetzt, die keine Kühlung erfordern wie der Versandt von getrocknetem Serum, Plasma oder Vollblut auf Filterpapieren. Für *HIV* wurde bereits gezeigt, dass sich daraus Viren und spezifische Antikörper nachweisen lassen [164, 165].

Die Notwendigkeit der Verbesserung von Überwachungsmaßnahmen auftretender Nebenwirkungen zeigte sich bereits in der Vergangenheit. Beispielsweise hat die Erfassung von gehäuften neurologischen Zwischenfällen nach GF-Impfung bei Kindern unter 9 Monaten [166] dazu geführt, dass die Immunisierung für Kinder unter 6 Monaten inzwischen kontraindiziert ist und für Kinder unter 9 Monaten nicht empfohlen wird [167]. Zusätzlich konnten weitere erhöhte Impfrisiken für Personen über 60 Jahren [168] und für Personen mit einer vorhergehenden Thymektomie [169] identifiziert werden. Ein Verdacht auf eine negative Auswirkung bei gleichzeitiger Impfung mit dem Tetanustoxoid bedarf

weiterer Untersuchungen, um bestätigt werden zu können [162]. Zur Bewältigung dieser Aufgabe wurde ein internationales Netzwerk aus Spezialisten aufgebaut, um Informationen zu bündeln und auszuwerten, damit die Impfung gegen GF in Zukunft noch sicherer wird, indem weitere Risikofaktoren identifiziert werden [170].

6.2 Die Immunreaktion nach einer GF-Impfung

In der Vergangenheit wurden diverse große Impfstudien mit GF-Impfstoffen durchgeführt, jedoch lag in diesen Fällen der Fokus auf der Vergleichbarkeit der Impfstoffe verschiedener Hersteller [171-174] oder der Untersuchung verschiedener Applikationsformen [79]. Die Ergebnisse dieser Studien liefern in der Regel Informationen über Serokonversionsraten, Antikörpertiter und die Häufigkeit von Nebenwirkungen, jedoch kaum Informationen über die immunologischen Abläufe nach der Impfung. Kleiner angelegte wissenschaftliche Impfstudien hatten einen sehr begrenzten Fokus auf einen Teilaspekt der immunologischen Reaktion, wie z.B. die Untersuchung beteiligter Toll-like Rezeptoren [100], die Genexpression [175] oder bestimmte Immunzellen [92, 101-103]. Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher, einen weit gefächerten Überblick über die immunologischen Abläufe in gesunden Erstimpfungen zu erhalten. Die Replikation des *GF-Virus* wurde durch den Nachweis von viralen Genomäquivalenten sowie über den Nachweis vermehrungsfähiger Viren im Blut charakterisiert. Zur Überwachung der humoralen Immunantwort wurden die Antikörpertiter der gelbfieberspezifischen IgM- und IgG-Antikörper bestimmt, sowie die protektiven neutralisierenden Antikörper nachgewiesen. Zusätzlich wurde das Expressionslevel von 40 inflammatorischen Zytokinen semiquantitativ bestimmt, um die Kommunikation zwischen den Zellen zu untersuchen. Im Rahmen einer Kooperation mit dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin wurde durch Frau Nicole Bethke die Kinetik verschiedener Immunzellen (NK-Zellen, dendritische Zellen, B-Zellen und T-Zellen) sowie das Auftreten *GFV*-spezifischer T-Zellen untersucht.

6.2.1 Verlauf der Virämie

Die Messung der viralen RNA im Serum zeigte, dass in 44 % der Probanden ein Nachweis der GÄ zwischen dem zweiten und siebten Tag, mit einer Häufung an Tag vier, erfolgreich war (siehe Tabelle 5.6 auf Seite 78). Der Nachweiszeitraum entsprach den Erwartungen aus anderen Studien [56]. In vergleichbaren Untersuchungen wurden ebenfalls Nachweisbarkeitsraten von etwa 50 % gezeigt [79]. Der leicht niedrigere Wert in dieser Arbeit legt die Vermutung nahe, dass an den Tagen fünf und sechs, an denen keine Proben genommen wurden, weitere positive Seren vorhanden gewesen sein könnten. In einer Studie aus dem Jahr 1998 wurden in allen 12 Impfungen virale RNA mit einer zweistufigen PCR [55]

nachgewiesen. Bei dieser Studie wurde der Gelbfieber Lebendimpfstoff RKI verwendet, der pro Dosis eine Viruslast von $1,5 \cdot 10^4$ [171] bis $4,8 \cdot 10^4$ [55] PFU/Dosis aufwies. Der in der vorliegenden Studie eingesetzte STAMARIL[®]-Impfstoff wies eine Viruslast von $6,3 \cdot 10^3$ [171] bis $3,5 \cdot 10^4$ [79] PFU/Dosis auf. Im Mittel entsprach die Viruslast des STAMARIL[®]-Impfstoffs somit nur 66 % der Viruslast aus der älteren Studie. Diese initial geringere Anzahl an Viren könnte die geringere Replikation bei den Probanden in der vorliegenden Studie erklären.

In Abhängigkeit der Nachweisbarkeit von Genomäquivalenten konnte festgestellt werden, dass diejenigen Probanden mit nachweisbaren GÄ über den gesamten Untersuchungszeitraum eine höhere Konzentration an CD56^{dim}CD16⁺ natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie CD11c⁺HLA-DR⁺ myeloiden dendritischen Zellen (mDZ) im Blut aufwiesen (siehe Abbildung 5.7 auf Seite 95). Setzt man die Infizierbarkeit der dendritischen Zellen voraus [100-103], so könnte die höhere Verfügbarkeit von primär infizierbaren Zellen und der damit einhergehende effektivere Transport in die Lymphknoten zu einer stärkeren Vermehrung der Viren und letztendlich zu dem nachweisbaren Auftreten der GÄ im Blut geführt haben. Im Gegensatz dazu sind NK-Zellen nicht infizierbar und tragen zu einer Eindämmung der eindringenden Viren bei. Es wäre daher zu erwarten gewesen, dass eine geringere Konzentration dieser Zellen zu einer besseren initialen Vermehrung der Viren und somit insgesamt zu einer höheren Konzentration an Viren geführt hätte. Das gegenteilige Ergebnis ist daher nicht eindeutig erklärbar.

Für die mDZ konnte zusätzlich zu dem Konzentrationsunterschied, bezogen auf die Nachweisbarkeit der Genomäquivalente an den Tagen drei bis sieben, eine generelle Konzentrationserhöhung festgestellt werden (siehe Abbildung 5.5 auf Seite 93). Zellen, die durch das Virus aktiviert wurden, wandern hauptsächlich über die Lymphgefäße in die ableitenden Lymphknoten [52, 176], weswegen es sich bei den im Blut nachweisbaren Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit um neu gebildete mDZ handelte. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass für die Entwicklung von DZ aus Knochenmarksvorläuferzellen, abhängig von der Subpopulation der DZ, die Zytokine GM-CSF [177-179], Flt3L [180] oder M-CSF [181] beteiligt sind. Speziell GM-CSF, welches von aktivierten Makrophagen und T-Zellen sezerniert wird, fördert die Entwicklung inflammatorischer DZ [182], sodass die Reaktion auf das Impfvirus wahrscheinlich die Produktion neuer dendritischer Zellen induziert hat, die über das Blut aus dem Knochenmark ins Gewebe transportiert werden. Die beteiligten Zytokine ließen sich in der Studie jedoch nicht nachweisen (siehe Tabelle 5.11 auf Seite 87).

Mit Abstand die höchste Konzentration an GÄ im Serum wiesen zwei FSME-geimpfte Probanden auf (>5.000 GÄ/mL). Eine Erklärung dafür könnte im sogenannten „antibody-dependent enhancement“ (ADE) liegen. Bei diesem Phänomen bewirken

subneutralisierende Antikörperkonzentrationen oder kreuzreaktive Antikörper nach Bindung an ein Virus eine beschleunigte Aufnahme der Komplexe in Immunzellen, die über einen $F_{c\gamma}RI$ - oder $F_{c\gamma}RII$ -Rezeptor verfügen, wie z.B. Monozyten, Makrophagen, B-Zellen oder dendritische Zellen [183]. Wird das aufgenommene Virus von den Zellen nicht erfolgreich neutralisiert und kann es sich zusätzlich in den Zellen vermehren, so bewirkt ADE eine schnelle Infektion primärer Zielzellen des Virus. ADE ist bei Dengue-Infektionen ein besonders gravierendes Problem, konnte aber auch für andere *Flaviviren* [184, 185] inklusive des *GFV* [186-190] gezeigt werden. Kommt es nach einer primären Dengue-Infektion zu einer sekundären Infektion mit einem anderen Dengue-Serotyp, so werden durch das ADE vermehrt die schwereren Dengue-Verläufe, wie das Dengue-Schock-Syndrom oder das Dengue-Hämorrhagische Fieber, ausgelöst [191].

Der Proband #13 wies durch die sechs Jahre zurückliegende FSME-Impfung bereits vor der GF-Impfung kreuzreaktive IgG-Antikörper (siehe Tabellen 5.7 und 5.8 auf den Seiten 81 bzw. 82) sowie einen hohen Titer neutralisierender *FSME-Virus*-Antikörper auf (Tabelle 5.10). Die hohe Konzentration an Genomäquivalenten könnte bei diesem Probanden somit durch „antibody-dependent enhancement“ ausgelöst worden sein. Eine Kreuzneutralisation der *GFV* durch die vorhandenen *FSME-Virus*-Antikörper fand in diesem Probanden offensichtlich nicht statt was allgemein bei den *Flaviviren* auch nicht zu erwarten ist [21, 192, 193]. Bei dem Probanden #18 lag die FSME-Immunsierung bereits 20 Jahre zurück und er erhielt damals nur eine Impfdosis anstatt der notwendigen drei Dosen [194], um einen vollen Schutz aufzubauen. Sowohl im IIFT als auch im *FSME-Virus*-PRNT konnten keine präexistierenden Antikörper nachgewiesen werden. Ein mögliches ADE von kreuzreaktiven Antikörpern war somit nicht nachweisbar, allerdings auch nicht völlig auszuschließen, da Titer unterhalb der Nachweisgrenze beteiligt gewesen sein könnten.

Bei zwei weiteren FSME-geimpften Probanden konnten keine viralen Genomäquivalente nachgewiesen werden, obwohl im IIFT kreuzreaktive Antikörper vorhanden waren (Tabelle 5.8).

Zusammengenommen konnte anhand der ermittelten Daten eine Verstärkung der Virusreplikation durch präexistierende kreuzreaktive *FSME-Virus*-Antikörper nicht belegt werden. In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass sowohl die Charakteristika des Antikörpers als auch des infizierenden Virus Einfluss auf das Auftreten oder Ausbleiben eines ADE-Effektes haben [187]. Es gibt zusätzlich Hinweise, dass zumindest für vorhandene neutralisierende Antikörper gilt, dass sie in hohen Konzentrationen einen Schutz vor der Infektion bewirken, in niedriger Konzentration jedoch zu einem ADE führen können [185, 195]. Trotz der Belege für ADE bei *Flaviviren* gibt es keine Hinweise in der Literatur, dass es durch Kreuzreaktivitäten der Antikörper zu Komplikationen in Folge von Impfungen

kam [21]. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass ein experimenteller Nachweis im Menschen nicht durchführbar ist und Ergebnisse nur auf allgemeinen Beobachtungen beruhen können.

Im Plaque-Test ließen sich innerhalb dieser Studie keine replikationsfähigen Viren nachweisen, was zu dem Ergebnis einer anderen Studie mit dem *GFV* 17D-Impfstamm passt, bei der dies ebenfalls nur bei 6 % der Probanden möglich war [173]. Es wurde gezeigt, dass die nachweisbaren *GFV*-Genomäquivalente (TaqMan[®]-PCR) die Anzahl an replikationsfähigen Viren (Plaque-Test) um einen Faktor von 1.000 bis 6.000 übersteigt [140, 196]. Der Grund dafür ist die Tatsache, dass die PCR auch defekte, nicht replikationsfähige Viruspartikel nachweisen kann, deren Bildung bei der Replikation für das *Hepatitis-C-Virus (HCV)* nachgewiesen wurde [197]. Unter Berücksichtigung dieses Verhältnisses und der Tatsache, dass für den eingesetzten Plaque-Test jeweils 100 µL Serum verwendet wurde, war selbst bei dem Probanden mit der höchsten Konzentration an GÄ (etwa 5.200 GÄ/mL) rechnerisch weniger als 0,5 infektiöse Partikel in den eingesetzten 100 µL zu erwarten, was das negative Ergebnis erklärt. In der gängigen Literatur [14, 56, 57, 61] wird von einer messbaren Virämie von 100-200 PFU/mL berichtet. Dieser Wert geht jedoch auf die bereits oben genannte Veröffentlichung von Reinhardt *et al.* aus dem Jahr 1998 zurück, in der eine deutlich höhere Virusmenge verabreicht wurde. Dies führte, wie bereits diskutiert, zu einer stärkeren Virämie bei etwa 60 % der Probanden. Die in der vorliegenden Studie gefundenen Daten zeigen, dass die Virämie zumindest mit dem STAMARIL[®]-Impfstoff deutlich geringer ausfällt als mit einem höher dosierten Impfstoff.

Insgesamt konnten in etwa der Hälfte der Probanden GÄ, jedoch keine infektiösen Partikel nachgewiesen werden, was auf eine recht schwache Replikation des Virus in den Probanden schließen lässt. Ein Einfluss einer bereits bestehenden FSME-Impfung konnte nicht belegt werden. Das Auftreten von *GFV*-Genomäquivalenten im Serum der Probanden konnte mit einer höheren Konzentration an mDZ und NK-Zellen assoziiert werden. Im Vergleich mit der Studie von Reinhardt *et al.* zeigte sich ein wahrscheinlicher Einfluss der initial verabreichten Impfdosis auf die Stärke der Virusreplikation.

6.2.2 Die humoralen Immunantwort

Der GF-Impfstoff zeichnet sich durch eine hervorragende Wirksamkeit aus, die sich in einer Serokonversionsrate von über 90 % widerspiegelt [16, 20, 55, 57, 79]. Dieses Ergebnis konnte in unserer Studie sowohl im IIFT (Tabelle 5.7 auf Seite 81) als auch im PRNT (Tabelle 5.9 auf Seite 84) belegt werden. In beiden Verfahren wurde bereits an Tag 14 bei allen Probanden eine Serokonversion festgestellt.

Im *GFV*-IIFT (Tabelle 5.7) wurden ab Tag 14 für alle Probanden *GFV*-spezifische AK nachgewiesen. Rechnerisch ergab sich ein konstanter IgM-Median von 1:100, sowie ein ansteigender IgG-Median von 1:100 auf 1:1.000 an Tag 60. Ein statistisch signifikanter Einfluss der Virämie oder des Geschlechtes des Probanden auf die AK-Titerhöhe ließ sich nicht nachweisen.

Innerhalb des Kollektivs fielen zwei Probanden durch nachweisbare Antikörpertiter im Referenzserum von Tag null auf (Tabelle 5.7). Bei dem Probanden #13 ließen sich IgG-Antikörper mit einem Titer von 1:32 nachweisen, wohingegen der Proband #16 einen ebenso hohen IgM-Antikörpertiter aufwies. Beide Probanden gehörten zu den vier FSME-geimpften Personen. Innerhalb der Familie der *Flaviviren* kommt es zu starken Kreuzreaktivitäten der Antikörper [157-159], die besonders bei der serologischen Diagnostik ein ernstzunehmendes Problem darstellen [198]. Die vier FSME-geimpften Probanden wurden daher auf das Vorhandensein von kreuzreaktiven *FSME-Virus*-Antikörpern durch einen Flaviviren-Profil 2-IIFT (siehe Tabelle 5.8 auf Seite 82) sowie einen *FSME-Virus*-spezifischen PRN-Test (Tabelle 5.10) untersucht. Der Proband #13 zeigte sowohl im IIFT als auch im PRN-Test *FSME-Virus*-spezifische Antikörper, die von der sechs Jahre zurückliegenden Impfung stammten und den präexistierenden AK-Titer erklären. Der nachgewiesene IgM-Titer des Probanden #16 ließ sich über kreuzreaktive *Flavivirus*-Antikörper nicht eindeutig erklären, da bei den Untersuchungen zur Kreuzreaktivität nur die *GFV*-spezifischen IgM-Antikörper (Titer 1:10) sowie ein sehr schwacher *FSME-Virus*-spezifischer IgG-Titer bestätigt werden konnten. Der leichte Abfall im nachgewiesenen IgM-Titer ist vermutlich auf das in der Zwischenzeit erfolgte mehrfache Auftauen und Einfrieren der Proben zurückzuführen.

Eine Erklärung für diese Beobachtung wäre eine sehr schwache Kreuzreaktion mit einem IgM-Antikörper gegen eine kürzlich durchgemachte Erkrankung des Probanden.

Auffällig an den IIFT-Daten war ebenfalls, dass von den fünf Probanden bei denen bereits an Tag zehn IgG-Antikörper nachweisbar waren, vier Personen bereits gegen FSME geimpft waren. Die Probanden #13 und #16 wiesen kreuzreaktive IgG-Antikörper auf, sodass die schnellere Reaktion auf die GF-Impfung auf der Aktivierung von bestehenden B-Zellen

beruht haben könnte. Bei dem Probanden #16 konnte diese These durch die Tatsache gestützt werden, dass an Tag 14 ein schwacher Titer an neutralisierenden *FSMEV*-Antikörpern nachgewiesen wurde, der an Tag null nicht vorhanden war. Bei ihm konnte die besonders schnelle Reaktion auf den GF-Impfstoff auch im PRN-Test gezeigt werden (Tabelle 5.9). Bei den Probanden #02 und #18 ließen sich keine präexistierenden IgG-Antikörper nachweisen. Eine mögliche Erklärung wäre das Vorhandensein sehr weniger B-Gedächtniszellen, die keinen messbaren Antikörpertiter bewirken, aber durch kreuzreaktive Antigene eine schnelle Aktivierung erfahren. Eine andere wäre eine schnellere Reaktion durch bereits existierende kreuzreaktive T-Helferzellen, die die Aktivierung der *GFV*-spezifischen B-Zellen beschleunigen.

Als zweite Methode zum Nachweis der Virämie wurde der Plaque-Reduktions-Neutralisationstest eingesetzt. Bei 16 der 18 Probanden wurden bereits an Tag zehn oder früher neutralisierende Antikörper nachgewiesen (siehe Tabelle 5.9 auf Seite 84). Im Vergleich zum IIFT (siehe Tabelle 5.7 auf Seite 81) wurde somit eine höhere Sensitivität des Neutralisationstestes gezeigt. In der Literatur wird ein Neutralisationstiter von 1:10, bei 90 %iger Virusneutralisation, als ausreichender Schutz vor einer Infektion angesehen [64-66]. Neben der 100 %igen Serokonversionsrate, konnte somit in dieser Studie auch der 100 %ige Aufbau eines Neutralisationsschutzes bestätigt werden (Tabelle 5.9). Das Auftreten der neutralisierenden Antikörper an Tag zehn bei den meisten Probanden passt zu dem am gleichen Tag gemessenen Anstieg der Plasmablastenkonzentration, die ihr Maximum an Tag 14 erreichte (siehe Abbildung 5.10 auf Seite 99). Zellen dieser Klasse werden durch den Kontakt mit dem passenden Antigen aktiviert und teilen sich massiv, um sich anschließend in Plasmazellen und in geringem Umfang in Gedächtniszellen zu differenzieren. Plasmazellen wandern in das Knochenmark und erhalten dort von Stromazellen Überlebenssignale, um weiterhin Antikörper in das Blut abzugeben. Gedächtniszellen wandern ebenfalls ins Knochenmark und besitzen die Fähigkeit, sich bei erneutem Kontakt mit dem passenden Antigen sehr schnell zu teilen und Plasmazellen zu bilden, was eine schnellere sekundäre Immunantwort ermöglicht. Die Konzentrationsabnahme der Plasmablasten an Tag 28 belegt die erfolgte Differenzierung zu Plasmazellen bzw. Gedächtniszellen [105].

Ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Titerhöhe konnte auf Basis dieser Daten nicht gezeigt werden. Die Ergebnisse solcher Vergleiche in anderen Studien scheinen sehr stark von dem gewählten Kollektiv abzuhängen, da es sowohl Studien gibt in denen ein Unterschied gefunden wurde [171, 172] als auch Untersuchungen in denen dies nicht möglich war [79, 193]. Ebenso konnte in Abhängigkeit der Nachweisbarkeit einer Virämie

mittels TaqMan[®]-PCR in der vorliegenden Studie kein signifikanter AK-Titerunterschied festgestellt werden. Dieses Ergebnis wurde ebenso in der Studie von Roukens *et al.* 2008 [79] gezeigt.

Ein Vergleich der gezeigten PRNT-Daten der vorliegenden Studie mit den Daten der Studie von Reinhardt *et al.* [55] zeigte erneut einen Unterschied in der Immunantwort, der auf die verwendeten Impfstoffe zurückzuführen sein könnte. In beiden Studien traten die ersten neutralisierenden Antikörper an vergleichbaren Tagen und in einer vergleichbaren Anzahl von Probanden auf. In der vorliegenden Studie wurden bei 2 von 18 Probanden schwache PRNT-Titer an Tag sieben nachgewiesen, in der Studie von Reinhardt *et al.* bei drei von zwölf Probanden an Tag sechs. Die durchschnittlichen PRNT-Titer nach 14 bzw. 28 Tagen lagen in der früheren Studie mit 1:71 bzw. 1:88 jedoch höher als in der vorliegenden Studie, in der Werte von 1:61 bzw. 1:66 (Tabelle 5.9) erreicht wurden. Es wurde bereits dargelegt, dass die Virämie in der Studie von Reinhardt *et al.* stärker ausgeprägt war (siehe Kapitel 6.2.1 auf Seite 124), was wahrscheinlich auf die höhere Impfdosis zurückzuführen ist. In Zusammenhang mit Impfwischenfällen, bei denen in der Regel sehr hohe Virustiter erreicht werden, wurden bei den Patienten häufig höhere PRNT-Titer festgestellt [83, 155, 160]. Somit kann auch der höhere PRNT-Titer mit der initialen Impfdosis assoziiert werden.

Die Höhe des Neutralisationstiter an Tag 14 wurde genutzt, um die Probanden in zwei Gruppen zu teilen und diese auf Unterschiede bezüglich der anderen Immunparameter zu untersuchen. Die Untersuchung der Zellkonzentrationen verschiedener Immunzellen in Abhängigkeit des Neutralisationstiter an Tag 14 ergab einen deutlichen Unterschied für die NK-Zellen. Sowohl die CD56^{dim} als auch die CD56^{bright} NK-Zellen waren bei den Probanden mit einem hohen PRNT-Titer deutlich niedriger konzentriert als bei den Probanden mit niedrigerem PRNT-Titer (siehe Abbildung 5.8 auf Seite 97). Dies passt zu der ursprünglichen Vermutung, dass eine schwächere angeborene Immunantwort zu einer initial stärkeren Vermehrung des Virus und somit zu einer stärkeren adaptiven Immunreaktion oder bei zu massiver Vermehrung sogar zu einem Impfwischenfall führen würde. Für die NK-Zellen ist dieser Zusammenhang jedoch nicht eindeutig, da bei Probanden mit nachweisbaren GFV-GÄ im Serum, also einer stärkeren Virusvermehrung, eine höhere NK-Zellkonzentration nachgewiesen wurde, was der These widerspricht (Abbildung 5.7 und Abschnitt 6.2.1 auf den Seiten 95 bzw. 124). Besonders interessant ist, dass bei den CD56^{dim}CD16⁺ Zellen in Abbildung 5.8 B vor der Impfung in beiden Teilgruppen die gleiche Ausgangskonzentration vorlag. Eine schlüssige Erklärung für das Absinken der Konzentration in der Probandengruppe mit dem hohen PRNT-Titer ist daher nicht möglich.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der vorliegenden Studie die exzellente Wirksamkeit des verwendeten Impfstoffes durch eine 100 %ige Konversionsrate und durch einen 100 %igen Aufbau eines protektiven, neutralisierenden Antikörpertiters belegt werden. Es zeigten sich Hinweise, dass nach einer bestehenden FSME-Impfung eine schnellere Antikörperantwort gegen das GFV aufgebaut wird, selbst wenn keine kreuzreaktiven FSMEV/GFV-Antikörper nachweisbar sind. Im Vergleich zu der Studie von Reinhardt *et al.* [55] zeigte sich, dass die initiale Impfdosis wahrscheinlich einen Einfluss auf die Titerhöhe an neutralisierenden Antikörpern hat.

Der PRN-Test erwies sich in der Studie als die sensitivere Methode zur Bestimmung der GFV-spezifischen Antikörper, jedoch ist es nicht möglich kreuzreaktive Antikörper zu bestimmen, da die neutralisierenden AK fast immer spezifisch sind. Für bestimmte Fragestellungen, ist daher der Einsatz des weniger sensitiven IIFT dennoch sinnvoll, da er zudem einen deutlich geringeren Arbeitsaufwand erfordert.

6.2.3 Zytokinausschüttung nach GF-Impfung

Die Charakterisierung des Zytokinprofils erfolgte durch die semiquantitative Erfassung der Proteinexpressionslevel von 40 verschiedenen Zytokinen im Serum der Probanden. 25 Zytokine ließen sich, bezogen auf den Median des Kollektivs, nicht nachweisen (siehe Tabelle 5.11 auf Seite 87). Darunter waren einige klassisch inflammatorische Zytokine, wie Interleukin-6 (IL-6) und der „tumor necrosis factor-alpha“ (TNF α). Zusätzlich wurde auch IL-8 nur minimal exprimiert, was zusammengenommen den milden Verlauf der Impfreaktion belegt, wie auch in anderen Studien gezeigt wurde [55, 97]. Anhand der nachweisbaren Zytokine im Serum wurde eine leichte Ausrichtung der Reaktion in Richtung einer T_H1-Antwort festgestellt, da von den einflussnehmenden Zytokinen lediglich IL-12p70 und Interferon gamma (IFN γ) nachweisbar waren (Tabelle 5.11). Die Präferenz einer T_H1-Antwort wurde ebenfalls bei der leichtesten Form der Dengue-Infektion, dem Dengue-Fieber nachgewiesen, wohingegen in schwereren Verläufen wie dem Dengue-Hämorrhagischen Fieber eher eine T_H2-Ausrichtung gezeigt wurde [116]. Auf der Ebene der T-Helferzellen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine gemischte T_H1-/T_H2-Antwort angeregt wurde (Daten nicht gezeigt) [121], wie bereits bei Santos *et al.* 2008 [120] für den 17DD-Impfstoff gezeigt werden konnte. Die Entstehung der T_H2-Zellen wurde möglicherweise durch lokale Zytokinexpression eingeleitet, deren Nachweis im Gesamtblut nicht möglich war.

Die Mediane jedes Zytokins wurden im Studienverlauf auf zeitliche Konzentrationsveränderungen hin untersucht (siehe Tabelle 5.12 auf Seite 88).

Für drei proinflammatorische Zytokine (IFN_γ , IL-12p70 und IL-1 α) wurde ein Anstieg der Konzentration nachgewiesen (siehe Tabelle 5.12 und Abbildung 6.1 auf den Seiten 88 bzw. 136). Die IFN_γ Konzentrationserhöhung konnte an Tag zwei und daraufhin ab Tag vier gezeigt werden, IL-12p70 und IL-1 α wurden an den Tagen zwei und zehn erhöht nachgewiesen (Tabelle 5.12 und Abbildung 5.4 F auf den Seiten 88 bzw. 90). IFN_γ ist nach heutiger Erkenntnis eher den Interleukinen mit einer immunmodulatorischen Wirkung als den Interferonen mit antiviralen Effekten zuzuordnen [199]. Es verstärkt beispielsweise die Expression von MHC-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen [200], bewirkt eine $\text{T}_\text{H}1$ -Immunantwort [201] und aktiviert natürliche Killerzellen [202]. IFN_γ wird hauptsächlich von aktivierten CD4^+ und CD8^+ T-Zellen [199, 201] sowie natürlichen Killerzellen [203, 204] ausgeschüttet. Die erste Erhöhung (Tag zwei) der Konzentration lässt sich daher sehr gut auf den zeitgleichen, leichten Anstieg der *GFV*-spezifischen CD4^+ und CD8^+ T-Zellen im Blut der Probanden zurückführen (Abbildung 5.9 auf Seite 98). Dieses sehr frühe Auftreten der *GFV*-spezifischen T-Zellen an Tag zwei im Blut wurde erstmals beschrieben, was die Sensitivität der eingesetzten Methode belegt. Üblicherweise wird für die aktivierten T-Zellen eine Verweildauer von drei bis vier Tagen in den Lymphknoten angenommen [205]. Die besonders früh auftretenden T-Zellen wurden vermutlich in den lokalen Lymphknoten nahe der Impfstelle aktiviert und sind daraufhin ins Blut gewandert.

Einhergehend mit der vermehrten IFN_γ Ausschüttung wurde im Verlauf der Studie eine Konzentrationsabnahme der natürlichen Killerzellen im Blut (siehe Abbildung 5.6 auf Seite 94), besonders der $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{CD16}^+$ NK-Zellen, die etwa 90 % der NK-Zellpopulation ausmachen [203], beobachtet. Das gleiche Phänomen wurde in der Studie von Martins *et al.* mit dem 17DD-Impfstoff festgestellt [206]. Es ist daher von einer Migration der Zellen in den Infektionsbereich und anschließender Aktivierung durch das ausgeschüttete IFN_γ auszugehen. Der erhöhte Nachweis von Chemokinen, die migratorisch auf natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wirken, wie MIP1 α/β [207-209], RANTES [207, 208], MIG [210] oder IP-10 [207, 208, 211] war in der Studie nicht möglich. Grund dafür kann eine lokale Wirkung der Chemokine sein, sodass der Nachweis im Gesamtblut der Probanden negativ ausfiel. Die NK-Zellen sind in der Lage ohne vorherige infektionserregerspezifische Aktivierung, infizierte Zellen zu erkennen und abzutöten, um somit die erste Ausbreitung der Erregers zu erschweren, bis die spezifischen Abwehrmechanismen aktiviert werden [106]. Nach der Aktivierung schütten die NK-Zellen wiederum IFN_γ und weitere Zytokine aus [203] und fördern damit die Einwanderung und Aktivierung weiterer Immunzellen unter anderem auch weiterer NK-Zellen. Somit ist die erhöhte Nachweisbarkeit von IFN_γ ab Tag vier auf die einwandernden NK-Zellen sowie an späteren Zeitpunkten zusätzlich auf die zunehmende Zahl an aktivierten *GFV*-spezifischen T-Zellen (Abbildung 5.9 auf Seite 98) zurückzuführen.

Für die Expression der anderen beiden nachgewiesenen proinflammatorischen Zytokine (IL-12p70 und IL-1 α) sind hauptsächlich Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen aber auch T-Zellen verantwortlich. Die ersten drei Zellarten phagozytieren unablässig Bestandteile ihrer Umgebung und prozessieren sie zur Präsentation auf der Zelloberfläche über MHC II-Moleküle, um Zellen der adaptiven Immunantwort zu aktivieren. Nach der Aufnahme von Infektionserregern, die über „Pattern Recognition Receptors“ (PRR) wie den „Toll-like“ Rezeptoren [212] als solche erkannt werden, sezernieren die aktivierten Zellen inflammatorische und chemotaktische Substanzen. Darunter auch die beiden Zytokine IL-12p70 [100, 213, 214] und IL-1 α [215, 216], sodass deren Konzentrationsanstieg an Tag zwei (Tabelle 5.12 auf Seite 88) auf diese drei Zelltypen in Kombination mit den auftretenden *GFV*-spezifischen T-Zellen [96] zurückzuführen ist. IL-12p70 führt ebenso wie IFN γ zu einer Aktivierung von NK-Zellen [217] und somit zu einer ersten Eindämmung der Infektion sowie zu einer Ausrichtung einer eher zellulären (T_H1) Immunantwort [218, 219]. IL-1 α wirkt allgemein inflammatorisch, indem es Fieber, Neutrophilie und die Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen [96] verursacht. Am Entzündungsort bewirkt IL-1 α die Aktivierung von ruhenden Makrophagen und die vermehrte Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen in vaskulären Endothelzellen [220]. Letzteres ermöglicht die Leukozytenwanderung aus den Blutgefäßen in den Bereich der Entzündung. Der zweite signifikante Anstieg der beiden Zytokine an Tag zehn fällt wiederum mit dem massiven Anstieg der *GFV*-spezifischen T-Zellen zusammen, sodass diese maßgeblich dafür verantwortlich zu machen sind. Interessant ist die Tatsache, dass bei allen drei Zytokinen (IFN γ , IL-12p70 und IL-1 α) an Tag 14 keine signifikante Erhöhung nachweisbar war, obwohl an diesem Tag das Maximum der spezifischen T-Zellen nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 5.9 auf Seite 98). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Infektion zu diesem Zeitpunkt bereits beendet war, was durch die Eliminierung des Virus aus dem Blut (siehe Tabelle 5.6 auf Seite 78) sowie das Erreichen des maximalen Neutralisationstiters (siehe Tabelle 5.9 auf Seite 84) gezeigt werden konnte. Die *GFV*-spezifischen T-Zellen zirkulieren weiterhin im Blut, sind jedoch nicht mehr ausreichend durch Zytokine aktiviert und schütten daher auch selbst keine inflammatorischen Zytokine aus. Eine weitere Bestätigung dieser These, z.B. durch das vorherige Auftreten des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, konnte nicht gezeigt werden.

Zwei weitere Mediatoren, die Chemokine I-309 und MCP-1, wurden zwischen den Tagen vier und zehn vermehrt im Blut nachgewiesen (Tabelle 5.12) und traten somit zeitlich zusammen mit der Verbreitung des Impfvirus über das Blut auf (Tabelle 5.6). Sie wirken chemotaktisch für Monozyten [96, 221] und erhöhen somit die Zahl der Monozyten respektive deren differenzierte Form, die Makrophagen [222], am Infektionsort, um freie Viren, Zellreste, Immunkomplexe etc. zu entfernen (siehe folgende Abbildung 6.1). Sezerniert werden beide

Zytokine von Monozyten und T-Lymphozyten, die bereits aktiviert am Infektionsort vorhanden sind [96, 221].

Im Gegensatz zu den vorgenannten Zytokinen wurde für einige Zytokine eine Abnahme der Konzentration im Verlauf der Immunreaktion gemessen (Tabelle 5.12). Lösliches ICAM-1 (sICAM-1) und TIMP-2 wurden bis auf wenige Untersuchungstage über den gesamten Zeitraum reduziert exprimiert (siehe Tabelle 5.12 und Abbildung 5.4 B und D auf den Seiten 88 bzw. 90). Die membrangebundene Variante des ICAM-1 wird konstitutiv auf Endothelzellen exprimiert und ist für das Einwandern von Immunzellen aus der Blutbahn in das umliegende Gewebe essenziell [223, 224]. Als Reaktion auf inflammatorische Zytokine wie IL-1 α wird die Expression verstärkt, um die Zahl der Immunzellen im Bereich der Infektion zu erhöhen [225].

Lösliches ICAM-1 wird von diversen Zellen produziert und hat eine ambivalente Funktion: Zum Einen kann es mit dem Hauptliganden „lymphocyte function-associated antigen-1“ (LFA-1) auf den Immunzellen um die Bindungsstellen auf dem Endothel konkurrieren, was die Einwanderung der Immunzellen erschwert. In dieser Funktion führt sICAM-1 eher zu einer anti-inflammatorischen Wirkung [226-229]. Zum Anderen wurde gezeigt, dass einige Zelllinien auf sICAM-1 mit der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie MIP-1 α [230, 231], TNF α , IFN γ oder IL-6 [232, 233] reagieren. Es wird vermutet, dass dabei ein nicht sicher identifizierter, membranständiger Rezeptor das sICAM-1 bindet und die Signalverarbeitung übernimmt [234, 235]. In schweren Krankheitsverläufen einer Dengue-Infektion wurde eine deutliche Erhöhung der sICAM-1 Konzentration festgestellt [236]. Die in der vorliegenden Studie nachgewiesene, reduzierte Expression von sICAM-1 bestätigt somit die insgesamt moderat verlaufende Immunreaktion. Zusätzlich bewirkt die Reduktion dieses kompetitiven Inhibitors eine erleichterte Adhäsion und somit eine stärkere Migration der Immunzellen in die infizierten Bereiche.

TIMP-2 wirkt als Inhibitor von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) [237], die unter anderem für den Abbau der Matrixproteine im Zellzwischenraum verantwortlich sind [238-240]. MMPs sind für die Invasion von Immunzellen unerlässlich, da die Zellen die interzelluläre Matrix passieren müssen [241] und werden daher von Immun- und Stomazellen als Reaktion auf proinflammatorische Zytokine wie TNF α [242] und IL-1 β [243] sezerniert. IFN γ hat die gegenteilige Wirkung auf die Ausschüttung von MMPs [244]. Die TIMPs begrenzen die Wirkung der MMPs und verhindern somit eine ausufernde Schädigung der Matrix über den Bereich der Entzündungsreaktion hinaus [241]. Das Absinken der TIMP-2 Konzentration innerhalb der Studie scheint daher die Wirkung der MMPs zu erleichtern und somit eine effektive Immunreaktion im Gewebe zu unterstützen. Die Wirkung zielt somit in die gleiche Richtung wie das Absinken der sICAM-1 Konzentration.

Für zwei lösliche Rezeptoren wurde ebenfalls eine Reduktion der Expression festgestellt. Der lösliche TNF-Rezeptor II (sTNF-RII) wurde in den ersten Tagen nach Impfung herunterreguliert, wohingegen der sTNF-RI nicht nachweisbar war (siehe Tabelle 5.12 und Abbildung 5.4 E auf den Seiten 88 bzw. 90). Die unterschiedliche Nachweisbarkeit der beiden Rezeptorklassen ist darauf zurückzuführen, dass der sTNF-RII universeller vorkommt und daher in einer höheren Konzentration vorliegt [245]. Beide Rezeptorklassen dienen als negative Regulatoren des TNF-Systems, indem sie TNF-Moleküle binden, ohne eine Wirkung zu entfalten [246, 247]. Sezerniert werden die sTNF-R von aktivierten neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Fibroblasten [248, 249] als Reaktion auf Interferone und TNF α selbst [249-251]. Das Expressionslevel der sTNF-Rezeptoren wird daher als Marker für die Aktivierung des TNF-Systems angesehen [252], was damit einhergeht, dass in schweren Krankheitsverläufen eine höhere Konzentration dieser Regulatoren festgestellt werden konnte [245, 253]. Das Absinken der sTNF-RII bzw. die Nichtnachweisbarkeit der sTNF-RI Konzentration in der Studie bestätigt somit ebenfalls den milden Verlauf der Impfreaktion, der damit einhergeht, dass TNF α/β nicht nachweisbar waren (siehe Tabelle 5.11 auf Seite 87), was in gesunden Personen zu erwarten ist [254].

Der zweite lösliche Rezeptor, für den ein niedrigeres Expressionslevel gefunden wurde, ist der lösliche IL-6 Rezeptor (IL-6 sR) [247], wie in Tabelle 5.12 (Seite 88) und Abbildung 5.4 C (Seite 90) gezeigt. IL-6 ist ein starker Induktor für die Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen in der Leber und somit für eine starke Immunantwort mitentscheidend [255]. IL-6 konnte in der Studie nicht nachgewiesen werden (Tabelle 5.11), sodass auch hier die fehlende IL-6 Expression eine Ausschüttung des negativen Regulators nicht notwendig macht.

Die Zytokine PDGF-BB und MIP-1 δ wurden ebenfalls als Reaktion auf die Impfung herunterreguliert (Tabelle 5.12 und Abbildung 5.4 A). Beide wirken, ähnlich wie I-309 und MCP-1, chemotaktisch auf Monozyten, wurden aber gegenläufig reguliert. Dieser Unterschied ist einerseits darauf zurückzuführen, dass die Zytokine verschiedene Auslösemechanismen besitzen z.B. ist der PDGF-BB an der Wundheilung beteiligt und andererseits, dass durch die milde Reaktion der Probanden nicht alle proinflammatorischen Wege aktiviert wurden.

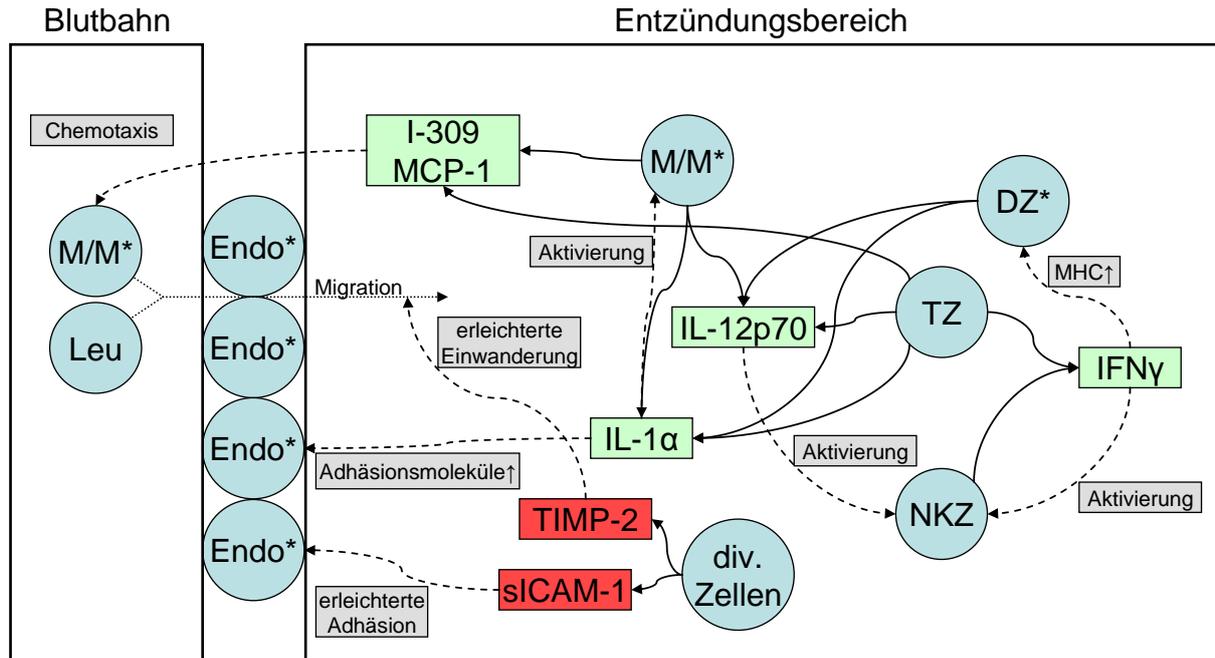


Abbildung 6.1: Wirkungsweise der nachgewiesenen Zytokine.

Dargestellt sind die nachgewiesenen Zytokine mit den jeweils ausschüttenden Zellen (durchgezogene Pfeile). Grün hinterlegte Zytokine wurden im Verlauf der Studie stärker, rot hinterlegte schwächer exprimiert. Zellen, die durch das *GFV* infizierbar sind, werden durch * gekennzeichnet. Gestrichelte Linien zeigen die Empfänger der Zytokinwirkung an, wobei die Art der Wirkung in den grau hinterlegten Kästen angegeben ist. Interferon gamma, welches von T-Zellen (TZ) sowie natürlichen Killerzellen (NKZ) exprimiert wird, bewirkt eine Aktivierung der NKZ sowie eine verstärkte Expression von MHC-Molekülen auf dendritischen Zellen (DZ). Ebenfalls aktivierend auf NKZ wirkt IL-12p70, welches von TZ, DZ und Monozyten und Makrophagen (M/M) exprimiert wird. I-309 und MCP-1 wurden im Verlauf der Studie ebenfalls stärker von M/M sowie T-Zellen ausgeschüttet. Diese beiden Chemokine locken Monozyten zum Infektionsort. IL-1 α wurde von M/M, DZ und TZ vermehrt sezerniert und wirkt aktivierend auf ruhende Makrophagen. Die Endothelzellen (Endo) der Blutgefäße reagieren auf IL-1 α mit einer stärkeren Expression von Adhäsionsmolekülen, um die Migration von Leukozyten (Leu) zu erleichtern. Ebenfalls fördernd auf die Migration von Immunzellen aus der Blutbahn in den Bereich der Infektion wirkt die verminderte Expression der Zytokine TIMP-2 und sICAM-1. Durch die geringere Konzentration des Inhibitors TIMP-2 können sezernierte Matrix-Metalloproteasen optimal wirken und eine leichtere Einwanderung der Zellen in das Gewebe ermöglichen. Lösliches ICAM-1 konkurriert mit den Endothelzellen um Bindungen auf Immunzellen im Blut, sodass eine geringere Konzentration die Adhäsion dieser Zellen an das Endothel erleichtert.

Zusätzlich zu den beschriebenen Konzentrationsveränderungen der Zytokine für das gesamte Kollektiv wurde untersucht, ob die Nachweisbarkeit der *GFV*-Genomäquivalente im Serum der Probanden (siehe Tabelle 5.6 auf Seite 78) einen Einfluss auf die Zytokinexpression hatte. Dazu wurden die Daten der Gruppen PCR-negativ/PCR-positiv statistisch verglichen. Das Ergebnis ist in Tabelle 5.13 auf Seite 91 dargestellt. Insgesamt wurden nur sehr wenige Unterschiede festgestellt, die jedoch alle Chemokine betrafen. Drei Chemokine (I-309, MCP-1 und MIP-1 δ) wirken migrationsfördernd auf Monozyten bzw. Makrophagen, jedoch lässt sich keine eindeutige Wirkrichtung feststellen. I-309 und MCP-1 zeigen an Tag sieben genau entgegengesetzte Veränderungen indem eines stärker, das andere schwächer exprimiert wurde. MIP-1 δ ist an Tag null und eins in der PCR-positiven Gruppe niedriger exprimiert. Der Einfluss dieses Unterschiedes ist jedoch sehr schwer

einzuschätzen, da für die anderen Monozyten-anlockenden Chemokine an diesen Tagen kein Unterschied festgestellt werden konnte.

RANTES wurde im Zeitraum der ausklingenden GÄ-Nachweisbarkeit in der PCR-positiven Gruppe weniger stark exprimiert. Es bewirkt die vermehrte Einwanderung von T-Zellen, dendritische Zellen, NK-Zellen und Mastzellen am Entzündungsort [98] und wird von Blutplättchen, Makrophagen, Endothelzellen und weiteren Zellen sezerniert. In schweren Krankheitsverläufen wurde eine starke RANTES-Expression nachgewiesen [83, 140]. Das Auftreten der GÄ im Blut der Probanden scheint nach den vorliegenden Daten jedoch kein ausreichender Stimulus für eine stärkere Expression von RANTES zu sein.

Analog zu der Untersuchung des Einflusses der Nachweisbarkeit der GÄ auf die Zytokine wurde der Einfluss der Qualität der humoralen Immunantwort analysiert. Dazu wurde die Zytokinexpression zwischen den Probanden mit einem hohen PRNT-Titer an Tag 14 mit denen verglichen, die einen niedrigen Titer aufwiesen (siehe Tabelle 5.14 auf Seite 92). Für die chemotaktischen Zytokine zeigte sich wiederum ein sehr uneinheitliches Bild, welches keine eindeutige Interpretation zulässt. Im Zeitraum zwischen Tag zwei und vier wurden jeweils zwei für Monozyten chemotaktische Zytokine in der Gruppe PRNT-hoch stärker (I-309 und MIP-1 β) und zwei schwächer (PDGF-BB und MCP-1) exprimiert. Es ist somit nicht nachzuvollziehen, welche Gesamtwirkung diese Veränderungen haben.

Für die Zytokine IFN γ und IL-6 sR wurde an wenigen Tagen eine stärkere Expression in der PRNT-hoch Gruppe nachgewiesen. Die leichte Erhöhung des IL-6 sR könnte auf eine ebenfalls leicht erhöhte IL-6 Produktion hindeuten, die jedoch weiterhin unterhalb des Detektionslimits des eingesetzten Testes liegt. Zusammen mit der stärkeren IFN γ Ausschüttung könnte dies ein schwaches Indiz für eine leicht stärkere Immunantwort sein. Auf Grund der Tatsache, dass jedoch keine anderen proinflammatorischen Zytokine stärker auftreten, ist der Zusammenhang zwischen der eventuell stärkeren Immunantwort und dem höheren Antikörpertiter in der Studie nur sehr schwach. Im Gegensatz dazu konnten bei aufgetretenen Impfwischenfällen, die mit einer schweren Erkrankung und damit auch mit einer massiven Immunantwort einhergehen, häufig hohe PRNT-Titer festgestellt werden [83, 155, 160].

Zusammenfassend belegt die Untersuchung der zeitlichen Konzentrationsänderung von 40 Zytokinen die von den Probanden bestätigte gute Verträglichkeit der Impfung und damit einhergehend eine milde Immunreaktion ohne Komplikationen. Einige proinflammatorische Zytokine, die für eine massive Immunreaktion notwendig sind, wie z.B. TNF α , IL-6 und IL-8

wurden nicht oder nur sehr schwach exprimiert. Bestätigt wurde dies durch die festgestellte Reduktion der Expression einiger negativer Regulatoren, wie den löslichen TNF-Rezeptoren und dem löslichen IL-6 Rezeptor. Die milde Immunreaktion konnte durch die gesteigerte Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen wie $IFN\gamma$, IL-12p70 und IL-1 α sowie der chemotaktischen Moleküle I-309 und MCP-1 gezeigt werden. Das Abklingen der Immunreaktion durch Expression von inhibitorischen Faktoren wie IL-10 oder löslichen Rezeptoren konnte nicht gezeigt werden. Die Nachweisbarkeit der *GFV*-Genomäquivalente im Verlauf der Immunreaktion hatte keinen Einfluss auf die Expressionslevel der Zytokine. Eine leichte Tendenz für eine stärkere Immunreaktion durch vermehrte Ausschüttung von $IFN\gamma$ und IL-6 sR konnte mit einem höheren PRNT-Titer an Tag 14 nach Impfung assoziiert werden.

Die Expressionsanalyse der Probanden mit der eingesetzten Zytokinmembran belegte die Vorteile dieses Systems. Es konnte mit geringem Probenvolumen ein sehr breiter Überblick über die auftretenden Zytokine erlangt werden. Zu berücksichtigen ist jedoch die starke individuelle Streuung unter den Probanden, die eine Medianbildung unerlässlich gemacht hat. Die geplante vergleichende Untersuchung mit afrikanischen Wildtypinfektionen (siehe Abschnitt 5.3 auf Seite 106) war auf Grund der fehlenden Hintergrundinformationen zu den untersuchten Proben nicht möglich. Es konnte lediglich festgestellt werden, dass die Patienten eine massive Zytokinexpression über das gesamte Spektrum der untersuchten Zytokine aufwiesen. Eine zeitliche Einordnung der Probenentnahme in Bezug zur Infektion ließ sich nur in einem Fall herstellen, was zur Folge hat, dass nicht mit Sicherheit ein Zusammenhang zwischen der Zytokinexpression und der *GFV*-Infektion hergestellt werden konnte. Es ist zu vermuten, dass bei Patienten, die in Afrika in einem Krankenhaus behandelt werden, auch andere Infektionskrankheiten, wie häufige Parasitosen, das Immunsystem stark beeinflussen. Bestätigt wurde diese Vermutung durch die Tatsache, dass in der durchgeführten Studie mit gesunden Probanden zwei gesondert betrachtet werden mussten (siehe folgender Abschnitt 6.2.4), weil bei ihnen aller Wahrscheinlichkeit nach im Untersuchungszeitraum impfungsunabhängige immunologische Reaktionen aufgetreten waren, die zu einer sehr deutlichen Veränderung der Expression geführt haben.

6.2.4 Betrachtung einzelner Probanden der Studie

Zwei Probanden wurden bei der Analyse der Zytokinmuster aus der Betrachtung herausgenommen, da beide massive Abweichungen von den anderen Probanden aufwiesen und statistisch als Ausreißer identifizierbar waren (siehe Grubbs-Test auf Seite 86).

Beide Probanden wiesen in Bezug auf die *GFV*-spezifischen Parameter (Antikörper, Virämie) keine Abweichungen von den Ergebnissen des Kollektivs auf (siehe Tabellen 5.15 und 5.17 auf den Seiten 100 bzw. 103). Auch bei den untersuchten zellulären Parametern wurden nur geringe Unterschiede festgestellt. Der Proband #20 wies lediglich eine leicht niedrigere Konzentration an CD56^{bright} NK-Zellen auf. Der Proband #12 wies Zellkonzentrationen an NK-Zellen (CD56^{bright} und CD56^{dim}) auf, die bezogen auf das Kollektiv an der unteren Konzentrationsgrenze lagen.

Bei dem Probanden #20 waren bereits vor der Impfung 28 von 40 Zytokine exprimiert, was ein deutliches Indiz für eine bereits bestehende subklinische Infektion darstellt. Die sehr ausgeprägte Zytokinexpression blieb bis zum zehnten Tag nach der Impfung bestehen und kehrte danach zu einem Expressionsmuster zurück, das den anderen Probanden der Studie entsprach, was ebenfalls für eine vorübergehende Infektion anderer Herkunft spricht. Das Phänomen, dass an Tag sieben bereits ein fast normales Expressionsmuster gemessen wurde, an Tag zehn jedoch wieder ein massiver Anstieg auf das Anfangsniveau festgestellt wurde, war nicht nachvollziehbar. Des Weiteren ist nicht erklärbar, warum die gemessenen hohen Zytokinwerte keinen Einfluss auf die untersuchten zellulären Parameter hatten.

Der Proband #12 wies ein ebenfalls deutlich breiteres Expressionsmuster als die Probanden des Impfkollektivs auf. Auch bei ihm waren 16 Zytokine bereits ab Tag null höher exprimiert, jedoch kam es ab Tag sieben zu einem deutlichen Anstieg der exprimierten Zytokine und deren Expressionslevel, der bis zum Ende der Studie anhielt. Auf Grund der hohen Expression über mehr als 28 Tage ist nicht von einer akuten Infektion auszugehen. Der Proband hatte angegeben, dass er unter anderem allergisch auf Birkenpollen reagiere. Er wurde Ende März geimpft, sodass sich der Untersuchungszeitraum bis Ende April erstreckte. In diesem Zeitraum liegt die höchste Belastung mit Birkenpollen vor, sodass davon auszugehen ist, dass die massive Zytokinexpression auf eine andauernde Exposition mit dem Allergen zurückzuführen ist.

6.3 Hemmung der viralen Replikation durch RNA-Interferenz

Die Entdeckung des *GFV*-Impfstammes hat die Bedrohung durch das *GFV* drastisch reduziert und seit der Einführung Millionen Menschen vor einer Infektion geschützt. Trotzdem infizieren sich nach WHO Angaben jährlich 200.000 Menschen mit dem Virus, von denen 30.000 sterben [17]. Die Dunkelziffer wird hierbei noch deutlich höher geschätzt. Nach einer Infektion ist lediglich eine unterstützende, symptomatische Behandlung möglich, da eine spezifische Therapie nicht verfügbar ist [61]. Es besteht daher trotz der Verfügbarkeit eines hervorragenden Impfstoffes dringender Bedarf an therapeutischen Ansätzen. Besonders bei viralen Infektionserregern ist ein spezifischer Ansatz sehr schwer zu finden, da die Viren für ihre Vermehrung sehr viele zelluläre Prozesse nutzen, in die nur sehr schwer eingegriffen werden kann. Der Ansatz der siRNA-basierten Intervention ermöglicht eine sequenzspezifische Spaltung der viralen RNA, die daraufhin abgebaut wird, ohne die Wirtszelle zu schädigen. In dieser Arbeit wurden Experimente durchgeführt, um die replikationshemmende Wirkung der siRNA in einem Zellkultursystem zu belegen.

Die ausgewählten hochspezifischen Zielsequenzen (siehe Tabelle 5.21 auf Seite 109) konnten ohne Mutationen in die Expressionsplasmide integriert und durch das optimierte Transfektionssystem (siehe Kapitel 5.4.4 auf Seite 111) in den Zellen exprimiert werden.

Das Expressionsplasmid, welches die gegen das Nicht-Strukturprotein 2a (NS2a) gerichtete siRNA#4 tragen sollte, ließ sich nicht herstellen. Die Sequenzierung brach stets an der gleichen Stelle ab, was die Vermutung nahe legte, dass sich Sekundärstrukturen ausgebildet haben, die eine erfolgreiche Sequenzierung verhinderten [256]. Die verbleibenden vier siRNAs wurden auf ihre Wirkung gegen den 17D-Impfstamm sowie den Asibi-Wildtypstamm getestet.

Die gegen das E-Protein gerichtete siRNA#1 zeigte sowohl gegen 17D als auch gegen Asibi über den gesamten Untersuchungszeitraum eine gute Reduktion der nachweisbaren GÄ in den Zellen und im Überstand auf etwa 40 % der Negativkontrolle, für die eine nicht *GFV*-spezifische siRNA verwendet wurde (siehe Abbildungen 5.13 und 5.15 auf den Seiten 115 bzw. 117). Die Replikation des Virus ließ sich somit trotz Anwesenheit von siRNAs nicht völlig unterbinden. Ein wichtiger Punkt hierfür ist die transiente Transfektion der Zellen, die eine Effizienz von 30 % erreichte. Eine Vielzahl der Zellen war somit nicht in der Lage siRNAs zu produzieren. Dieses Problem ließe sich durch die Herstellung einer Zelllinie umgehen, die die siRNA stabil exprimiert. Entscheidend für die Wirkung bleibt jedoch weiterhin die siRNA, wie Vergleiche mit Studien in denen stabile Zelllinien eingesetzt wurden zeigen. Yang *et al.* [257] konnten die Replikation des *West-Nil-Virus* trotz einer stabilen

Zelllinie nur auf etwa 26-40 % senken, Ong *et al.* auf unter 0,01 % [258] jeweils bezogen auf die Negativkontrolle. Des Weiteren kann es auch in erfolgreich transfizierten Zellen zu einer Replikation kommen, da die Zerstörung der viralen RNA durch den RISC-Komplex ein nicht gerichteter Prozess ist und somit von der Konzentration des Komplexes, sowie der Effizienz der Bindung der siRNA an den RISC-Komplex abhängt. Ein weiterer entscheidender Punkt ist die Zugänglichkeit der Zielsequenz. Können die beladenen RISC-Komplexe ihre Zielsequenz auf Grund von Sekundärstrukturen oder durch gebundene Proteine nicht effizient binden, so kommt es auch nur zu einer ineffizienten Zerstörung der Ziel-RNA [138, 259]. Die unterschiedliche Effizienz bei der Erkennung der Zielsequenz zeigte sich bei dem Vergleich der siRNAs#1 und #2. Beide Zielsequenzen liegen innerhalb des E-Proteins etwa 200 Basen voneinander entfernt, was bei erfolgter RISC-vermittelter Zerstörung der vRNA zu einem gleicheffizienten Abbau der Teilstücke führen sollte. Trotzdem zeigte siRNA#2 bis zum dritten Tag nach der Infektion kaum Wirkung auf die Replikation auf Genomäquivalentebene. Dieses Ergebnis unterstreicht die Notwendigkeit der *in vitro* Experimente, da die rein computergestützte Vorhersage der Effizienz von siRNAs nicht zwingend in der Realität zutrifft.

Die Ergebnisse der Reduktion von viraler RNA in den Zellen wie auch im Zellkulturüberstand spiegeln sich auch in der gemessenen Konzentration an replikativen Viruspartikeln wieder (siehe Abbildungen 5.14 und 5.16 auf den Seiten 115 bzw. 118). Die siRNA#1 reduziert die Menge sowohl an ausgeschleusten sowie in den Zellen nachweisbaren infektiösen 17D- und Asibi-Partikeln an den Tagen zwei und drei auf 30-40 % der Negativkontrolle. Die Ergebnisse der siRNA#2 zeigen auch hier eine deutlich schwächere Reduktion. Interessant ist, dass besonders bei dem Nachweis der infektiösen 17D-Partikel bei allen untersuchten siRNAs am ersten Tag keine Reduktion nachweisbar war (siehe Abbildung 5.14 auf Seite 115), obwohl zum gleichen Zeitpunkt für die siRNAs #1, #3 und #4 auf der vRNA-Ebene eine deutliche Reduktion gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 5.13 auf Seite 115). Der Grund dafür könnte die zeitliche Verzögerung der Proteinexpression sein. Die siRNA wirkt auf die viralen Genome und reduziert deren Anzahl bereits in den ersten 24 Stunden, was nachgewiesen wurde. Es kommt jedoch nicht zu einer völligen Unterbindung der Replikation, was dazu führt, dass die Translation der viralen Proteine anlaufen kann. In dieser frühen Phase kommt es noch zu keinem messbaren Unterschied zwischen der Negativkontrolle und den mit spezifischen siRNAs-transfizierten Zellen. Nach 48 Stunden korrelieren die gemessene Reduktion auf Ebene der GÄ mit der Ebene der infektiösen Partikeln sehr gut, was zeigt, dass die Translation auf Grund der eliminierten vRNAs in den Zellen durch die spezifischen siRNA ebenfalls drastisch reduziert wurde. Gestützt wird diese These dadurch, dass der beschriebene Effekt bei den mit Asibi infizierten Zellen nicht so deutlich ausgeprägt ist

(Abbildung 5.16 auf Seite 118). Im Vergleich zu 17D ist der Asibi-Wildtypstamm nicht adaptiert und repliziert schneller und stärker in infizierten Zellen. Die Reduktion auf Genomebene wirkt sich daher bereits früher auf die Produktion neuer infektiöser Partikel aus, als das bei 17D der Fall war.

Nach 24 Stunden zeigte die Untersuchung der infektiösen Partikel in den Zellen sowie im Überstand der Zellen, die mit der siRNA#2 transfiziert waren, sogar eine Zunahme der Replikation des *17D-Virus*. Eine logische Erklärung für dieses Phänomen ließ sich nicht finden. Jedoch trat ein ähnlicher Effekt bei Bai *et al.* auf. In einem *in vivo* Experiment an Mäusen starben mehr Tiere, die mit einer spezifischen *WNV*-siRNA behandelt wurden, als in der Kontrollgruppe. Diese spezielle siRNA schien also die Infektion in den Tieren zu verstärken und somit zu der höheren Sterberate zu führen.

SiRNA#3, die gegen das NS1-Protein gerichtet war, zeigte im Vergleich mit siRNA#1 gegen 17D eine vergleichbare, gegen den Wildtypstamm sogar eine bessere Wirkung mit einer Reduktion der infektiösen Partikel auf 5-7 %. Dieses Ergebnis ist in Bezug auf die 30 %ige Transfektionseffizienz hervorragend, da in einer vergleichbaren Untersuchung mit einer stabilen Zelllinie eine Reduktion der 17DD-Replikation auf 2,8 % erreicht wurde [138]. In dieser Studie wurde die Wirkung nicht gegen den Wildtypstamm getestet, sodass die Aussagen für einen therapeutischen Ansatz nur sehr bedingt heranzuziehen sind.

Die gegen den 3'-nicht-translatierten Bereich (3'-NTR) gerichtete siRNA#5 reduzierte die Replikation der beiden Virusstämme sowohl auf Genom- als auch auf Partikelebene etwas schlechter als siRNA#1.

Obwohl die drei siRNAs #1, #3 und #5 gegen verschiedene Bereiche der viralen RNA gerichtet sind, waren die Effekte auf die Replikation vergleichbar. Alle zielen somit auf eine für den RISC-Komplex gut zugängliche Sequenz innerhalb des Virusgenoms. Unterschiede auf Grund der Lage der Zielsequenz sind bei dem *GFV* theoretisch nicht zu erwarten gewesen, da das *GFV*-Genom unsegmentiert ist. Die RISC-induzierte Spaltung mit dem anschließenden Abbau der Spaltprodukte führt theoretisch stets zur vollständigen Zerstörung des Genoms, was durch die ähnliche Wirkung der unterschiedlichen Zielsequenzen gezeigt werden konnte. Abweichungen in der Wirkung, wie sie für siRNA#2 aufgetreten sind oder in anderen Untersuchungen gezeigt wurden [138, 258], betreffen, wie bereits beschrieben, eher die Effizienz der Bindung der siRNA an den RISC-Komplex oder die Zugänglichkeit der Zielsequenz in der viralen RNA.

Bei einer messbaren Hemmung der viralen Replikation in Zellen, wie sie für die *GFV*-spezifischen siRNAs gezeigt wurde, ist stets auch eine Beteiligung des unspezifisch

wirkenden Interferon-Systems zu bedenken. Das Auftreten von langer doppelsträngiger RNA in Zellen, die ein Zeichen einer Virusreplikation ist, wird hauptsächlich über die Rezeptoren „serine-threonin kinase PKR“ [260] und TLR3 [261] erkannt und führt zur Aktivierung des Interferonsystems. Dies ist für die Expression verschiedener Gene, sowie die Abschaltung der Proteinbiosynthese bis hin zur Apoptose der Zelle verantwortlich [262]. Kurze doppelsträngige RNA-Moleküle (~ 20 Nukleotide) wie sie typischerweise im Zusammenhang mit siRNAs auftreten werden in der Regel nicht von dem System detektiert [126, 263]. Eine Möglichkeit dies zu belegen ist zu zeigen, dass klassische IFN-induzierte Gene wie PKR und MxA nicht stärker exprimiert werden, wenn die Zellen mit siRNA behandelt wurden [264].

Aus zeitlichen Gründen war eine dahingehende Untersuchung jedoch nicht mehr möglich. Trotz des fehlenden Nachweises ist eine IFN-Beteiligung an der gezeigten replikationshemmenden Wirkung unwahrscheinlich. In einer anderen Studie innerhalb der Arbeitsgruppe mit dem *FSME-Virus* wurden die gleichen Zellen mit dem gleichen siRNA-Expressionssystem transfiziert und es konnte eine vergleichbare Wirkung der *FSMEV*-spezifischen siRNAs gezeigt werden. Einen Unterschied im Replikationsverhalten unter Anwesenheit einer unspezifischen siRNA und ohne siRNA wurde jedoch nicht festgestellt, was zeigte, dass keine IFN-Aktivierung durch die Anwesenheit der siRNA erfolgte.

Für einen therapeutischen Ansatz gegen das Wildtypvirus eignet sich nach den ersten Untersuchungen die siRNA#3 besonders gut, da die Reduktion der infektiösen Partikel am stärksten war. Da die vorliegende Untersuchung die einzige ist, in der die Wirkung der siRNAs auf den Wildtypstamm untersucht wurde, ist ein Wirkungsvergleich nicht möglich. In weiterführenden Untersuchungen mit siRNA#3 müsste gezeigt werden, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Replikationshemmung auftritt, wenn die Verabreichung der siRNA nach der Infektion erfolgt, was für die mögliche Behandlung einer Infektion unerlässlich ist. Das weitaus größere Problem stellt jedoch der Einsatz der siRNA im Menschen dar. Als GF-Therapie wäre eine systemische Verabreichung über das Blut notwendig, um alle Zielorgane des *GFV* zu erreichen. Dazu muss die Stabilität der siRNA über chemische Modifikationen im Blut erhöht werden, um die Bioverfügbarkeit über einen längeren Zeitraum zu gewähren [265]. Ein besonderes Problem ist die Einschleusung der siRNA in die Zielzellen, da viele der *in vitro* eingesetzte Techniken nicht möglich sind oder ein sehr hohes Risiko bei der Anwendung bergen.

Nicht selektive, systemische Verabreichungen wurden in Tieren erfolgreich, z.B. über die Kopplung an Cholesterin-Gruppen, erreicht, sodass es zu einer rezeptorvermittelten Aufnahme in Leber und Dünndarm kam [266]. Eine Übertragung auf den Menschen würde jedoch sehr große Mengen an Verabreichungs-Komplexen erfordern, was teuer und

unpraktikabel wäre [267]. Ein vielversprechender Ansatz wäre eine Kopplung der siRNA an *GFV*-spezifische Antikörperfragmente, die die Aufnahme in infizierte Zellen vermitteln. Dies wurde z.B. für Zellen gezeigt, die ein *HIV*-spezifisches Protein exprimieren [268]. Der Komplex wurde von *HIV* infizierten T-Zellen aufgenommen und reduzierten das Proteinlevel um mehr als 70 %. Dieser Ansatz reduziert die Menge an zu verabreichender siRNA, da nicht alle Zellen damit ausgestattet werden. Auf der anderen Seite ist nicht vorhersehbar, ob dieses Vorgehen die Infektion soweit verlangsamt, damit das Immunsystem die Viren eliminieren kann.

Ist es notwendig, die Expression der siRNAs in den Zellen möglichst lange zu gewährleisten, so werden virale Systeme verwendet. Lentivirale Vektoren integrieren in das Zellgenom und ermöglichen so eine stabile Expression der siRNAs. Die *ex vivo* Transduktion von haematopoetischen Stammzellen und Refusion in *HIV*-Patienten wäre ein möglicher Einsatz dieser Technik [269]. Das große Problem dieser Methode ist die ungerichtete Integration des Virus in das Genom, die zu Veränderungen in einzelnen Genen führen kann [267, 270]. Nicht integrierende, adenovirale Ansätze führen zu einer längeren Expression, da die Expressionskassette als Plasmid parallel zum Genom in den transduzierten Zellen vorliegt. Bei wiederholter Anwendung kann es jedoch zu einer Immunreaktion gegen den Vektor kommen.

Die Wirksamkeit für drei der vier untersuchten siRNAs konnte in dem Zellkultursystem eindeutig belegt werden, wobei die Reduktion vergleichbar mit anderen Studien ist, obwohl nur etwa 1/3 der Zellen transfiziert wurden. Die siRNA#3 eignet sich anhand der Daten besonders für weiterführende Experimente, mit dem langfristigen Ziel eine spezifische Therapie gegen das *GFV* zu entwickeln. Sie ist bisher die einzige siRNA, deren Wirkung gegen den Wildtypstamm bewiesen wurde.

7 Zusammenfassung

Die Bedrohung durch das *GFV* nimmt weltweit wieder zu, was umfangreiche Gegenmaßnahmen, wie z.B. Impfkampagnen notwendig macht. Der eingesetzte Impfstoff ist höchsteffektiv. Jedoch traten in den letzten Jahren vermehrt Nebenwirkungen auf, deren Ursachen größtenteils unbekannt sind. Massenimpfungen bieten die Gelegenheit Risikofaktoren durch eine gezielte Überwachung zu untersuchen. Im Rahmen der begleitenden Untersuchung von drei Kampagnen mit rund 12 Mio. Impfungen wurden lediglich 26 mögliche schwere Impfwiszenfälle an das RKI gemeldet, wobei in 6 Fällen der Verdacht erhärtet wurde. Die geringe Meldungsrate sowie die schlechten Transportbedingungen der Proben haben dringenden Verbesserungsbedarf offengelegt. Das RKI war daher an der Entwicklung von WHO-Richtlinien beteiligt, die durch standardisierte Verfahren die Überwachung der Nebenwirkungen verbessern sollen.

Neben der Erfassung von Impfwiszenfällen ist die Erforschung ihrer Ursachen nicht nur für den Einsatz des GF-Impfstoffes, sondern auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer chimärer Impfstoffe auf der Basis des 17D-Stammes sehr wichtig. Entscheidend dafür ist ein umfassender Einblick in die Immunreaktion nach der Impfung. Zu diesem Zweck wurde eine Impfstudie mit dem kommerziell erhältlichen GF-Impfstoff durchgeführt.

Die hervorragende Wirksamkeit des Impfstoffes konnte in dieser Studie bestätigt werden. Bei allen Probanden wurde ein protektiver Antikörpertiter innerhalb von 14 Tagen aufgebaut. Im Vergleich mit einer anderen Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der Höhe des neutralisierenden Antikörpertiters und der initialen Impfdosis vermutet werden. Bereits am zweiten Tag nach der Impfung ließ sich die Aktivierung der angeborenen Immunität durch die höhere Expression proinflammatorischer Zytokine belegen. Die insgesamt milde, aber deutlich messbare Immunreaktion konnte über den Studienverlauf durch die erhöhte Expression von Zytokinen und Chemokinen sowie die verringerte Ausschüttung von Inhibitoren gezeigt werden. Als Ursache für diese milde Reaktion konnte die sehr schwache Virämie identifiziert werden, die nur über Genomäquivalente nicht aber über infektiöse Partikel im Blut nachweisbar war. Interessanterweise konnte bereits kurz nach der Impfung ein zweiphasiges Auftreten *GFV*-spezifischer T-Zellen im Blut nachgewiesen werden, was die erfolgreiche Aktivierung der adaptiven zellulären Immunantwort bestätigt.

Im Hinblick auf schwere Impfwiszenfälle sowie die weltweit zunehmende Zahl von GF-Wildtypinfektionen steigt der Bedarf an einer spezifischen Therapie. Durch *in vitro* siRNA-Experimente konnte für vier verschiedene siRNAs gezeigt werden, dass sie die Replikation des *GFV* 17D signifikant reduzieren. Eine der untersuchten siRNAs zeigte eine besonders effektive Wirkung auf den Asibi-Wildtypstamm, was die Grundvoraussetzung für

einen möglichen therapeutischen Ansatz ist. Diese vielversprechenden Ergebnisse bilden somit die Basis der Entwicklung dieser antiviralen Strategie.

8 Summary

The *yellow fever virus* (YFV) reemerges in several countries and is threatening an increasing population. This raises the demand for comprehensive countermeasures like WHO mass vaccination campaigns. The vaccine is considered to be very safe but nevertheless serious adverse events following immunisation (AEFI) were reported in recent years. The origin of these adverse events is unknown in the majority of cases. As the adverse events are quite rare, mass vaccination campaigns give the opportunity to identify risk factors by close surveillance. Within this work 26 possible AEFI from 12 million vaccinations were analysed and six cases were possibly related to vaccination. The low rate of announced AEFI, as well as the poor sample conditions at arrival, clearly demonstrate the demand for basic improvements. Under WHO leadership the RKI participated in the development of generalised guidelines to standardise the AEFI surveillance.

Surveillance and research on AEFI are necessary with regard to the already established yellow fever vaccine and additionally for the newly developed chimeric vaccines based on the 17D-strain. Therefore a comprehensive knowledge on the immune response after vaccination is required.

The efficiency of the administered vaccine was confirmed by the vaccination study. All vaccinees developed a protective antibody titre on day 14. Comparing these results with former studies a connection between the antibody titre and the initial amount of administered virus can be identified. Two days after vaccination the stimulation of innate immunity was detectable by the increased expression of certain inflammatory cytokines. In general the immune response was very mild but clearly measurable on the basis of increased concentrations of inflammatory cytokines and chemokines, as well as the reduction of some inhibitory factors. One reason for the mild reaction was the low viremia, which was only detectable on the level of genome equivalents but not on the level of infectious particles. Surprisingly YFV-specific T-cells appeared in two waves already on day two after vaccination, proving the successful cell based adaptive immune reaction.

The severe AEFI and the increasing number of YFV infections highlight the demand for the development of a virus-specific therapy. This work proved the significant reduction of 17D-virus replication in the presence of four different siRNAs in cell culture. One of these siRNAs showed a remarkable effect on the replication of the wild type virus which is a basic requirement for a therapeutic approach. These promising results generate the background for the development of a virus-specific strategy.

9 Veröffentlichungen

Publikationen, die aus dieser Arbeit hervorgehen:

S. Kohler*, N. Bethke*, M. Böthe*, S. Sommerick, D. Teuwen, M. Frentsch, C. Romagnani, M. Niedrig#, A. Thiel# (*, # gleichwertige Beteiligung der Autoren)

Early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination

eingereicht: Blood - Journal of the American Society of Hematology

Weitere Publikationen:

M. Niedrig und M. Böthe

Gelbfieber – Eine zunehmende Gefahr

MedWelt, 2008. 59: p.257-60

S. Keller, M. Böthe, M. Bienert, M. Dathe and A. Blume

A Simple Fluorescence-Spectroscopic Membrane Translocation Assay

ChemBioChem, 2007. 8(5): p.546-52

10 Literaturverzeichnis

1. Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E. *et al.*, *Fields Virology*. 5. ed. 2007, Philadelphia, P.A.: Wolters Kluwer, Pippincott, Williams and Wilkins.
2. Zanotto, P.M., Gould, E.A., Gao, G.F. *et al.*, *Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 548-53.
3. Sall, A.A., Faye, O., Diallo, M. *et al.*, *Yellow fever virus exhibits slower evolutionary dynamics than dengue virus*. J Virol, 2010. **84**(2): p. 765-72.
4. Barrett, A.D. and Higgs, S., *Yellow fever: a disease that has yet to be conquered*. Annu Rev Entomol, 2007. **52**: p. 209-29.
5. Reed, W., Carroll, J. and Agaramonte, A., *The ethiology of yellow fever*. JAMA, 1901. **86**: p. 431-40.
6. Aitken, T.H., Tesh, R.B., Beaty, B.J. *et al.*, *Transovarial transmission of yellow fever virus by mosquitoes (Aedes aegypti)*. Am J Trop Med Hyg, 1979. **28**(1): p. 119-21.
7. Beaty, B.J., Tesh, R.B. and Aitken, T.H., *Transovarial transmission of yellow fever virus in Stegomyia mosquitoes*. Am J Trop Med Hyg, 1980. **29**(1): p. 125-32.
8. Soper, F.L., Wilson, D.B., Lima, S. *et al.*, *The Organization of Permanent Nationwide Anti-Aedes aegypti Measures in Brasil*. 1943, New York: The Rockefeller Found.
9. Monath, T.P., *The Arboviruses: ecology and epidemiology*. Yellow fever, ed. T.P. Monath. Vol. V. 1988, Boca Raton (FL): CRC Press. 139-231.
10. Soper, F.L., *Clinical tropical medicine*. Yellow fever, ed. F.L. Soper. 1944, New York City: Paul B Hoeber. 391-420.
11. Schliesman, D.J. and Calheiros, L.B., *A review of the status of yellow fever and Aedes aegypti eradication programs in the Americas*. Mosq. News, 1974. **34**: p. 1-9.
12. Severson, D.W., Knudson, D.L., Soares, M.B. *et al.*, *Aedes aegypti genomics*. Insect Biochem Mol Biol, 2004. **34**(7): p. 715-21.
13. Theiler, M. and Smith, H.H., *The Use of Yellow Fever Virus Modified by in Vitro Cultivation for Human Immunization*. J Exp Med, 1937. **65**(6): p. 787-800.
14. Monath, T.P., *Yellow fever vaccine*. Expert Rev Vaccines, 2005. **4**(4): p. 553-74.
15. Gubler, D.J., *The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle?* Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2004. **27**(5): p. 319-30.
16. Niedrig, M. and Böthe, M., *Gelbfieber - Eine zunehmende Gefahr*. MedWelt, 2008. **59**: p. 257-60.
17. Tomori, O., *Yellow fever in Africa: public health impact and prospects for control in the 21st century*. Biomedica, 2002. **22**(2): p. 178-210.
18. Nasidi, A., Monath, T.P., DeCock, K. *et al.*, *Urban yellow fever epidemic in western Nigeria, 1987*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1989. **83**(3): p. 401-6.
19. Monath, T.P., *Yellow fever: Victor, Victoria? Conqueror, conquest? Epidemics and research in the last forty years and prospects for the future*. Am J Trop Med Hyg, 1991. **45**(1): p. 1-43.
20. Barnett, E.D., *Yellow fever: epidemiology and prevention*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(6): p. 850-6.
21. Barnett, E.D., Wilder-Smith, A. and Wilson, M.E., *Yellow fever vaccines and international travelers*. Expert Rev Vaccines, 2008. **7**(5): p. 579-87.
22. Gubler, D.J., *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(3): p. 480-96.
23. WHO, *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. 2 ed. 1997, Geneva: World Health Organization. 84.

24. WHO, *Influenza (Seasonal)*. Factsheet N°211. 2009, [cited 2010]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>.
25. WHO, *HIV/AIDS*. 2010, [cited 2010]; Available from: <http://www.who.int/features/qa/71/en/index.html>.
26. WHO, *Yellow fever, countries or areas at risk, 2008*. [cited 2010]; Available from: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_YFRisk_IHRRiskMap.png.
27. WHO, *Global health partners mobilize to counter yellow fever*. [cited 2010]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr23/en/>.
28. Reiter, P., *Yellow fever and dengue: a threat to Europe?* Euro Surveill, 2010. **15**(10): p. 19509.
29. ProMED-mail, *PRO/EDR> Aedes mosquitoes, imported - Netherlands: (NB)*. 2010, International Society for Infectious Diseases.
30. ProMED-mail, *PRO/EDR> Aedes albopictus - France: 1st report*. 2009, International Society for Infectious Diseases.
31. ProMED-mail, *PRO/EDR> Aedes albopictus - Spain*. 2004, International Society for Infectious Diseases.
32. Hemmer, C.J., Frimmel, S., Kinzelbach, G. et al., *Global warming: trailblazer for tropical infections in Germany?* Dtsch Med Wochenschr., 2007. **132**(48): p. 2583-9.
33. Cavrini, F., Gaibani, P., Pierro, A.M. et al., *Chikungunya: an emerging and spreading arthropod-borne viral disease*. J Infect Dev Ctries, 2009. **3**(10): p. 744-52.
34. Geiss, B.J., Thompson, A.A., Andrews, A.J. et al., *Analysis of flavivirus NS5 methyltransferase cap binding*. J Mol Biol, 2009. **385**(5): p. 1643-54.
35. Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G. et al., *Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion*. Cell, 2002. **108**(5): p. 717-25.
36. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J. and Rossmann, M.G., *A structural perspective of the flavivirus life cycle*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(1): p. 13-22.
37. Lorenz, I.C., Allison, S.L., Heinz, F.X. et al., *Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum*. J Virol, 2002. **76**(11): p. 5480-91.
38. Stiasny, K., Fritz, R., Pangerl, K. et al., *Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion*. Amino Acids, 2009.
39. Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. et al., *Molekulare Virologie. Flaviviren*. 2010, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 196-224.
40. Stiasny, K., Allison, S.L., Marchler-Bauer, A. et al., *Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 8142-7.
41. Stiasny, K., Bressanelli, S., Lepault, J. et al., *Characterization of a membrane-associated trimeric low-pH-induced Form of the class II viral fusion protein E from tick-borne encephalitis virus and its crystallization*. J Virol, 2004. **78**(6): p. 3178-83.
42. Allison, S.L., Schalich, J., Stiasny, K. et al., *Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH*. J Virol, 1995. **69**(2): p. 695-700.
43. Guirakhoo, F., Bolin, R.A. and Roehrig, J.T., *The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein*. Virology, 1992. **191**(2): p. 921-31.
44. Heinz, F.X., Stiasny, K., Puschner-Auer, G. et al., *Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM*. Virology, 1994. **198**(1): p. 109-17.
45. Lindenbach, B.D. and Rice, C.M., *Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function*. J Virol, 1999. **73**(6): p. 4611-21.

46. Lindenbach, B.D. and Rice, C.M., *trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9608-17.
47. Muylaert, I.R., Chambers, T.J., Galler, R. *et al.*, *Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence*. Virology, 1996. **222**(1): p. 159-68.
48. Lindenbach, B.D. and Rice, C.M., *Molecular biology of flaviviruses*. Adv Virus Res, 2003. **59**: p. 23-61.
49. Kiermayr, S., Kofler, R.M., Mandl, C.W. *et al.*, *Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 8078-84.
50. Kummerer, B.M. and Rice, C.M., *Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles*. J Virol, 2002. **76**(10): p. 4773-84.
51. Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R. *et al.*, *Flavivirus genome organization, expression, and replication*. Annu Rev Microbiol, 1990. **44**: p. 649-88.
52. Monath, T.P. and Barrett, A.D., *Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever*. Adv Virus Res, 2003. **60**: p. 343-95.
53. Miller, S., Sparacio, S. and Bartenschlager, R., *Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B*. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8854-63.
54. Westaway, E.G., Mackenzie, J.M. and Khromykh, A.A., *Replication and gene function in Kunjin virus*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. **267**: p. 323-51.
55. Reinhardt, B., Jaspert, R., Niedrig, M. *et al.*, *Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection*. J Med Virol, 1998. **56**(2): p. 159-67.
56. Querec, T.D. and Pulendran, B., *Understanding the role of innate immunity in the mechanism of action of the live attenuated Yellow Fever Vaccine 17D*. Adv Exp Med Biol, 2007. **590**: p. 43-53.
57. Monath, T.P., *Yellow fever: an update*. Lancet Infect Dis, 2001. **1**(1): p. 11-20.
58. Hotta, S., Ohyama, A., Fujita, N. *et al.*, *Propagation of yellow fever virus (17D strain) in primary trypsinized cell cultures*. Am J Trop Med Hyg, 1962. **11**: p. 811-6.
59. Deubel, V., Mouly, V., Salaun, J.J. *et al.*, *Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with standard tests used to detect yellow fever virus antibodies*. Am J Trop Med Hyg, 1983. **32**(3): p. 565-8.
60. Bae, H.G., Nitsche, A., Teichmann, A. *et al.*, *Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay*. J Virol Methods, 2003. **110**(2): p. 185-91.
61. Barrett, A.D. and Teuwen, D.E., *Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place?* Curr Opin Immunol, 2009. **21**(3): p. 308-13.
62. Niedrig, M., Kursteiner, O., Herzog, C. *et al.*, *Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against yellow fever virus*. Clin Vaccine Immunol, 2008. **15**(2): p. 177-81.
63. Porterfield, J.S., *A plaque technique for the titration of yellow fever virus and antisera*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1959. **53**: p. 458-66.
64. Lang, J., Zuckerman, J., Clarke, P. *et al.*, *Comparison of the immunogenicity and safety of two 17D yellow fever vaccines*. Am J Trop Med Hyg, 1999. **60**(6): p. 1045-50.
65. Niedrig, M., Lademann, M., Emmerich, P. *et al.*, *Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA*. Trop Med Int Health, 1999. **4**(12): p. 867-71.
66. Mason, R.A., Tauraso, N.M., Spertzel, R.O. *et al.*, *Yellow fever vaccine: direct challenge of monkeys given graded doses of 17D vaccine*. Appl Microbiol, 1973. **25**(4): p. 539-44.

67. Poland, J.D., Calisher, C.H., Monath, T.P. *et al.*, *Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine*. Bull World Health Organ, 1981. **59**(6): p. 895-900.
68. Monath, T.P. and Cetron, M.S., *Prevention of yellow fever in persons traveling to the tropics*. Clin Infect Dis, 2002. **34**(10): p. 1369-78.
69. Monath, T.P., Cetron, M. and Teuwen, D., *Vaccines*. 5. ed. Yellow Fever, ed. S. Plotkin, W. Orenstein, and P. Offit. 2008, Saunders: Elsevir. 959-1055.
70. Macnamara, F.N., *A clinico-pathological study of yellow fever in Nigeria*. West Afr Med J, 1957. **6**(4): p. 137-46.
71. Barrett, A.D., *Yellow fever vaccines*. Biologicals, 1997. **25**(1): p. 17-25.
72. Monath, T.P., *Treatment of yellow fever*. Antiviral Res, 2008. **78**(1): p. 116-24.
73. Smithburn, K.C., Durieux, C., Koerber, R. *et al.*, *Yellow Fever Vaccination*. Mass yellow fever vaccination in French Africa south of the Sahara, ed. C. Durieux. 1956, Geneva: World Health Organization. 115-21.
74. Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R. *et al.*, *Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution*. Science, 1985. **229**(4715): p. 726-33.
75. Hahn, C.S., Dalrymple, J.M., Strauss, J.H. *et al.*, *Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(7): p. 2019-23.
76. Dupuy, A., Despres, P., Cahour, A. *et al.*, *Nucleotide sequence comparison of the genome of two 17D-204 yellow fever vaccines*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(10): p. 3989.
77. Pulendran, B., *Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 741-7.
78. Pugachev, K.V., Guirakhoo, F. and Monath, T.P., *New developments in flavivirus vaccines with special attention to yellow fever*. Curr Opin Infect Dis, 2005. **18**(5): p. 387-94.
79. Roukens, A.H., Vossen, A.C., Bredenbeek, P.J. *et al.*, *Intradermally administered yellow fever vaccine at reduced dose induces a protective immune response: a randomized controlled non-inferiority trial*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1993.
80. Strokes, A., Bauer, J.H. and Hudson, N.P., *Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals*. Am J Trop Med, 1928. **8**: p. 103.
81. Markowitz, L.E., Albrecht, P., Orenstein, W.A. *et al.*, *Persistence of measles antibody after revaccination*. J Infect Dis, 1992. **166**(1): p. 205-8.
82. CDC, *Possible Side-effects from Vaccines*. Yellow Fever vaccine side-effects. 2009, [cited 2010]; Available from: <http://www.cdc.gov/vaccines/vac-gen/side-effects.htm#yf>.
83. Pulendran, B., Miller, J., Querec, T.D. *et al.*, *Case of yellow fever vaccine--associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes*. J Infect Dis, 2008. **198**(4): p. 500-7.
84. Receveur, M.C., Bruyand, M., Pistone, T. *et al.*, *Yellow fever vaccination: update on rare and severe adverse effects*. Med Mal Infect, 2009. **39**(4): p. 234-41.
85. McMahon, A.W., Eidex, R.B., Marfin, A.A. *et al.*, *Neurologic disease associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of 15 cases*. Vaccine, 2007. **25**(10): p. 1727-34.
86. Eidex, R.B., Hayes, E.B. and Russell, M., *Centers for Disease Control and Prevention. Health Information for International Travel*. Yellow fever. 2007, GA, USA: US Department of Health and Human Services.
87. Louis, J.J., Chopard, P. and Larbre, F., *Un cas d'encephalite après vaccination anti-amarile par la souche*. Pédiatrie, 1981. **36**: p. 539.
88. Smithburn, K.C., xxx, h., xxx.hl. *et al.*, *Yellow Fever Vaccination*. Reactions following vaccination against yellow fever., ed. G. Stuart. 1956, Geneva: World Health Organization.

89. WHO, *Surveillance of adverse events following immunization against yellow fever*. FIELD GUIDE for staff at the central, intermediate and peripheral level. [cited 2010]; Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/HSE_GAR_ERI_2010_1/en/index.html.
90. Fitzner, J., Coulibaly, D., Kouadio, D.E. *et al.*, *Safety of the yellow fever vaccine during the September 2001 mass vaccination campaign in Abidjan, Ivory Coast*. *Vaccine*, 2004. **23**(2): p. 156-62.
91. Guy, B., Guirakhoo, F., Barban, V. *et al.*, *Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses*. *Vaccine*, 2010. **28**(3): p. 632-49.
92. Co, M.D., Terajima, M., Cruz, J. *et al.*, *Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E*. *Virology*, 2002. **293**(1): p. 151-63.
93. Beutler, B., *Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling*. *Nature*, 2004. **430**(6996): p. 257-63.
94. Iwasaki, A. and Medzhitov, R., *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(10): p. 987-95.
95. Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S., *Toll-like receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 335-76.
96. Fitzgerald, K.A., O'Neill, L.A.J., Gearing, A.J.H. *et al.*, *THE CYTOKINE Facts Book*. 2. ed. 2001, San Diego: Academic Press.
97. Khaiboullina, S.F., Rizvanov, A.A., Holbrook, M.R. *et al.*, *Yellow fever virus strains Asibi and 17D-204 infect human umbilical cord endothelial cells and induce novel changes in gene expression*. *Virology*, 2005. **342**(2): p. 167-76.
98. Levy, J.A., *The unexpected pleiotropic activities of RANTES*. *J Immunol*, 2009. **182**(7): p. 3945-6.
99. Liprandi, F. and Walder, R., *Replication of virulent and attenuated strains of yellow fever virus in human monocytes and macrophage-like cells (U937)*. *Arch Virol*, 1983. **76**(1): p. 51-61.
100. Querec, T., Bennouna, S., Alkan, S. *et al.*, *Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity*. *J Exp Med*, 2006. **203**(2): p. 413-24.
101. Miller, J.D., van der Most, R.G., Akondy, R.S. *et al.*, *Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines*. *Immunity*, 2008. **28**(5): p. 710-22.
102. Barba-Spaeth, G., Longman, R.S., Albert, M.L. *et al.*, *Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes*. *J Exp Med*, 2005. **202**(9): p. 1179-84.
103. Palmer, D.R., Fernandez, S., Bisbing, J. *et al.*, *Restricted replication and lysosomal trafficking of yellow fever 17D vaccine virus in human dendritic cells*. *J Gen Virol*, 2007. **88**(Pt 1): p. 148-56.
104. Roukens, A.H. and Visser, L.G., *Yellow fever vaccine: past, present and future*. *Expert Opin Biol Ther*, 2008. **8**(11): p. 1787-95.
105. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. *et al.*, *Immunologie*. 5. ed, Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
106. Lodoen, M.B. and Lanier, L.L., *Natural killer cells as an initial defense against pathogens*. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(4): p. 391-8.
107. Shortman, K. and Liu, Y.J., *Mouse and human dendritic cell subtypes*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(3): p. 151-61.
108. Pulendran, B., *Variation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors*. *J Immunol*, 2005. **174**(5): p. 2457-65.

109. Krieg, A.M., *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 709-60.
110. Krug, A., French, A.R., Barchet, W. *et al.*, *TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function*. Immunity, 2004. **21**(1): p. 107-19.
111. Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M. *et al.*, *The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens*. Nature, 1999. **401**(6755): p. 811-5.
112. Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H. *et al.*, *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1529-31.
113. Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H. *et al.*, *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
114. Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A. *et al.*, *Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5598-603.
115. Germain, R.N., *An innately interesting decade of research in immunology*. Nat Med, 2004. **10**(12): p. 1307-20.
116. Chaturvedi, U.C., Agarwal, R., Elbishbishi, E.A. *et al.*, *Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2000. **28**(3): p. 183-8.
117. Gordon, K.B., Gorski, K.S., Gibson, S.J. *et al.*, *Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1259-68.
118. Ito, T., Wang, Y.H. and Liu, Y.J., *Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9*. Springer Semin Immunopathol, 2005. **26**(3): p. 221-9.
119. Coccia, E.M., Severa, M., Giacomini, E. *et al.*, *Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 796-805.
120. Santos, A.P., Matos, D.C., Bertho, A.L. *et al.*, *Detection of Th1/Th2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 152-5.
121. Kohler, S., Bethke, N., Böthe, M. *et al.*, *Early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination*. Submitted: Blood - Journal of the American Society of Hematology.
122. Hussain, A.I., Johnson, J.A., Da Silva Freire, M. *et al.*, *Identification and characterization of avian retroviruses in chicken embryo-derived yellow fever vaccines: investigation of transmission to vaccine recipients*. J Virol, 2003. **77**(2): p. 1105-11.
123. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K. *et al.*, *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
124. Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D. *et al.*, *A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(47): p. 18002-7.
125. Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F. *et al.*, *A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling*. Science, 2006. **312**(5772): p. 436-9.
126. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W. *et al.*, *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
127. Singh, S.K., Pal Bhadra, M., Girschick, H.J. *et al.*, *MicroRNAs--micro in size but macro in function*. FEBS J, 2008. **275**(20): p. 4929-44.
128. Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V. *et al.*, *MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1764-7.
129. Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J. *et al.*, *Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 515-24.

130. Hajeri, P.B. and Singh, S.K., *siRNAs: their potential as therapeutic agents--Part I. Designing of siRNAs*. Drug Discov Today, 2009. **14**(17-18): p. 851-8.
131. Damm-Welk, C., Fuchs, U., Wossmann, W. *et al.*, *Targeting oncogenic fusion genes in leukemias and lymphomas by RNA interference*. Semin Cancer Biol, 2003. **13**(4): p. 283-92.
132. Ge, Q., McManus, M.T., Nguyen, T. *et al.*, *RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2718-23.
133. Gitlin, L., Karelsky, S. and Andino, R., *Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells*. Nature, 2002. **418**(6896): p. 430-4.
134. Coburn, G.A. and Cullen, B.R., *Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference*. J Virol, 2002. **76**(18): p. 9225-31.
135. Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S. *et al.*, *Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(11): p. 2705-16.
136. Kaiser, P.K., Symons, R.C., Shah, S.M. *et al.*, *RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027*. Am J Ophthalmol, 2010. **150**(1): p. 33-39 e2.
137. Kumar, P., Lee, S.K., Shankar, P. *et al.*, *A single siRNA suppresses fatal encephalitis induced by two different flaviviruses*. PLoS Med, 2006. **3**(4): p. e96.
138. Pacca, C.C., Severino, A.A., Mondini, A. *et al.*, *RNA interference inhibits yellow fever virus replication in vitro and in vivo*. Virus Genes, 2009. **38**(2): p. 224-31.
139. Travanty, E.A., Adelman, Z.N., Franz, A.W. *et al.*, *Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol, 2004. **34**(7): p. 607-13.
140. Bae, H.G., *Analyse der Immunantwort nach Infektion mit Gelbfieberviren*, in *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2006, Freie Universität Berlin.
141. Niedrig, M., Klockmann, U., Lang, W. *et al.*, *Monoclonal antibodies directed against tick-borne encephalitis virus with neutralizing activity in vivo*. Acta Virol, 1994. **38**(3): p. 141-9.
142. Promega, *siRNA Target Designer*. [cited 2007]; Available from: <http://www.promega.com/sirnadesigner/Default.htm>.
143. Sambrook, J. and Gething, M.J., *Protein structure. Chaperones, paperones*. Nature, 1989. **342**(6247): p. 224-5.
144. Radonic, A., Thulke, S., Bae, H.G. *et al.*, *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*. Virol J, 2005. **2**: p. 7.
145. Ferguson, M. and Heath, A., *Collaborative study to assess the suitability of a candidate International Standard for yellow fever vaccine*. Biologicals, 2004. **32**(4): p. 195-205.
146. Lobigs, M., Dalgarno, L., Schlesinger, J.J. *et al.*, *Location of a neutralization determinant in the E protein of yellow fever virus (17D vaccine strain)*. Virology, 1987. **161**(2): p. 474-8.
147. Reed, L.J. and Muench, H., *A simple method of estimating fifty per cent endpoints*. Am. J. Hyg., 1938. **27**(3): p. 493-97.
148. RayBiotech, *RayBio® Human Inflammation Array 3*. Manual. 2009, [cited 2010]; Available from: <http://www.raybiotech.com/manual/Antibody%20Array/AAH-CYT.pdf>.
149. WHO, *Weekly Epidemiological Record (WER)*, 2008. **83**, No. 50: p. 457
150. Plotkin, S.A. and Mortimer, E.A., *Vaccines. Yellow fever vaccine*, ed. D.S. Freestone. 1994, Philadelphia: W.B. Saunders. 741-779.
151. Grabbe, S., Kampgen, E. and Schuler, G., *Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional*. Immunol Today, 2000. **21**(9): p. 431-3.
152. Frentsch, M., Arbach, O., Kirchoff, D. *et al.*, *Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression*. Nat Med, 2005. **11**(10): p. 1118-24.

153. Martins, M.A., Silva, M.L., Marciano, A.P. *et al.*, *Activation/modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after 17DD yellow fever first-time vaccination: is this the key to prevent severe adverse reactions following immunization?* Clin Exp Immunol, 2007. **148**(1): p. 90-100.
154. Birnstiel, M.L., *Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles*. Functions of the abundant U-snRNPs., ed. J.A. Steitz, et al. 1988, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. 115-154.
155. Doblaz, A., Domingo, C., Bae, H.G. *et al.*, *Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease and death in Spain*. J Clin Virol, 2006. **36**(2): p. 156-8.
156. Martin, M., Tsai, T.F., Cropp, B. *et al.*, *Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases*. Lancet, 2001. **358**(9276): p. 98-104.
157. Allwinn, R., Doerr, H.W., Emmerich, P. *et al.*, *Cross-reactivity in flavivirus serology: new implications of an old finding?* Med Microbiol Immunol, 2002. **190**(4): p. 199-202.
158. Makino, Y., Tadano, M., Saito, M. *et al.*, *Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections*. Microbiol Immunol, 1994. **38**(12): p. 951-5.
159. Kayser, M., Klein, H., Paasch, I. *et al.*, *Human antibody response to immunization with 17D yellow fever and inactivated TBE vaccine*. J Med Virol, 1985. **17**(1): p. 35-45.
160. Bae, H.G., Domingo, C., Tenorio, A. *et al.*, *Immune response during adverse events after 17D-derived yellow fever vaccination in Europe*. J Infect Dis, 2008. **197**(11): p. 1577-84.
161. Adebayo, A.A., Sim-Brandenburg, J.W., Emmel, H. *et al.*, *Stability of 17D yellow fever virus vaccine using different stabilizers*. Biologicals, 1998. **26**(4): p. 309-16.
162. Kitchener, S., *Viscerotropic and neurotropic disease following vaccination with the 17D yellow fever vaccine, ARILVAX*. Vaccine, 2004. **22**(17-18): p. 2103-5.
163. Yameogo, T.M., Breugelmans, J.G., Kambou, J.L. *et al.*, *Surveillance system for adverse events following immunization against yellow fever in Burkina Faso in 2008. Good practice recommendations*. Med Trop (Mars), 2009. **69**(4): p. 320-1.
164. Hamers, R.L., Smit, P.W., Stevens, W. *et al.*, *Dried fluid spots for HIV type-1 viral load and resistance genotyping: a systematic review*. Antivir Ther, 2009. **14**(5): p. 619-29.
165. Evengard, B., Ehrnst, A., von Sydow, M. *et al.*, *Effect of heat on extracted HIV viral infectivity and antibody activity using the filter paper technique of blood sampling*. AIDS, 1989. **3**(9): p. 591-5.
166. Plotkin, S.A. and Orenstein, W.A., *Vaccine*. Yellow fever vaccine, ed. T.P. Monath. 2004, Philadelphia: Elsevir. 1095-176.
167. Gil, A., Gonzalez, A., Dal-Re, R. *et al.*, *Interference assessment of yellow fever vaccine with the immune response to a single-dose inactivated hepatitis A vaccine (1440 EL.U.). A controlled study in adults*. Vaccine, 1996. **14**(11): p. 1028-30.
168. Khromava, A.Y., Eidex, R.B., Weld, L.H. *et al.*, *Yellow fever vaccine: an updated assessment of advanced age as a risk factor for serious adverse events*. Vaccine, 2005. **23**(25): p. 3256-63.
169. Barwick, R., *History of thymoma and yellow fever vaccination*. Lancet, 2004. **364**(9438): p. 936.
170. Barrett, A.D., Niedrig, M. and Teuwen, D.E., *International laboratory network for yellow fever vaccine-associated adverse events*. Vaccine, 2008. **26**(43): p. 5441-2.
171. Pfister, M., Kursteiner, O., Hilfiker, H. *et al.*, *Immunogenicity and safety of BERNA-YF compared with two other 17D yellow fever vaccines in a phase 3 clinical trial*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **72**(3): p. 339-46.
172. Monath, T.P., Nichols, R., Archambault, W.T. *et al.*, *Comparative safety and immunogenicity of two yellow fever 17D vaccines (ARILVAX and YF-VAX) in a phase III multicenter, double-blind clinical trial*. Am J Trop Med Hyg, 2002. **66**(5): p. 533-41.

173. Camacho, L.A., de Aguiar, S.G., Freire Mda, S. *et al.*, *Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial*. Rev Saude Publica, 2005. **39**(3): p. 413-20.
174. WHO, *Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: implications for the Brazilian National Immunization Program*. Vaccine, 2007. **25**(16): p. 3118-23.
175. Querec, T.D., Akondy, R.S., Lee, E.K. *et al.*, *Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 116-25.
176. del Rio, M.L., Bernhardt, G., Rodriguez-Barbosa, J.I. *et al.*, *Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 268-81.
177. Ebner, S., Ratzinger, G., Krosbacher, B. *et al.*, *Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 633-41.
178. Inaba, K., Inaba, M., Romani, N. *et al.*, *Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1693-702.
179. Sallusto, F. and Lanzavecchia, A., *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
180. Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J.L. *et al.*, *Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures*. Blood, 2000. **96**(9): p. 3029-39.
181. Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V. *et al.*, *Langerhans cells arise from monocytes in vivo*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 265-73.
182. Schmid, M.A., Kingston, D., Boddupalli, S. *et al.*, *Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 32-44.
183. Littaua, R., Kurane, I. and Ennis, F.A., *Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection*. J Immunol, 1990. **144**(8): p. 3183-6.
184. Phillipotts, R.J., Stephenson, J.R. and Porterfield, J.S., *Antibody-dependent enhancement of tick-borne encephalitis virus infectivity*. J Gen Virol, 1985. **66 (Pt 8)**: p. 1831-7.
185. Wallace, M.J., Smith, D.W., Broom, A.K. *et al.*, *Antibody-dependent enhancement of Murray Valley encephalitis virus virulence in mice*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 7): p. 1723-8.
186. Schlesinger, J.J. and Brandriss, M.W., *Growth of 17D yellow fever virus in a macrophage-like cell line, U937: role of Fc and viral receptors in antibody-mediated infection*. J Immunol, 1981. **127**(2): p. 659-65.
187. Barrett, A.D. and Gould, E.A., *Antibody-mediated early death in vivo after infection with yellow fever virus*. J Gen Virol, 1986. **67 (Pt 11)**: p. 2539-42.
188. Brandt, W.E., McCown, J.M., Gentry, M.K. *et al.*, *Infection enhancement of dengue type 2 virus in the U-937 human monocyte cell line by antibodies to flavivirus cross-reactive determinants*. Infect Immun, 1982. **36**(3): p. 1036-41.
189. Gould, E.A. and Buckley, A., *Antibody-dependent enhancement of yellow fever and Japanese encephalitis virus neurovirulence*. J Gen Virol, 1989. **70 (Pt 6)**: p. 1605-8.
190. Schlesinger, J.J. and Brandriss, M.W., *Antibody-mediated infection of macrophages and macrophage-like cell lines with 17D-yellow fever virus*. J Med Virol, 1981. **8**(2): p. 103-17.
191. Malavige, G.N., Fernando, S., Fernando, D.J. *et al.*, *Dengue viral infections*. Postgrad Med J, 2004. **80**(948): p. 588-601.
192. Pond, W.L., Ehrenkranz, N.J., Danauskas, J.X. *et al.*, *Heterotypic serologic responses after yellow fever vaccination; detection of persons with past St. Louis encephalitis or dengue*. J Immunol, 1967. **98**(4): p. 673-82.
193. Belmusto-Worn, V.E., Sanchez, J.L., McCarthy, K. *et al.*, *Randomized, double-blind, phase III, pivotal field trial of the comparative immunogenicity, safety, and tolerability of two yellow fever*

- 17D vaccines (Arilvax and YF-VAX) in healthy infants and children in Peru. *Am J Trop Med Hyg*, 2005. **72**(2): p. 189-97.
194. Loew-Baselli, A., Konior, R., Pavlova, B.G. et al., *Safety and immunogenicity of the modified adult tick-borne encephalitis vaccine FSME-IMMUN: results of two large phase 3 clinical studies*. *Vaccine*, 2006. **24**(24): p. 5256-63.
195. Morens, D.M., Halstead, S.B. and Marchette, N.J., *Profiles of antibody-dependent enhancement of dengue virus type 2 infection*. *Microb Pathog*, 1987. **3**(4): p. 231-7.
196. Barban, V., Girerd, Y., Aguirre, M. et al., *High stability of yellow fever 17D-204 vaccine: a 12-year retrospective analysis of large-scale production*. *Vaccine*, 2007. **25**(15): p. 2941-50.
197. Pawlotsky, J.M., Bouvier-Alias, M., Hezode, C. et al., *Standardization of hepatitis C virus RNA quantification*. *Hepatology*, 2000. **32**(3): p. 654-9.
198. Houghton-Trivino, N., Montana, D. and Castellanos, J., *Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis*. *Rev Salud Publica (Bogota)*, 2008. **10**(2): p. 299-307.
199. Billiau, A. and Matthys, P., *Interferon-gamma: a historical perspective*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009. **20**(2): p. 97-113.
200. Steeg, P.S., Moore, R.N., Johnson, H.M. et al., *Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by a lymphokine with immune interferon activity*. *J Exp Med*, 1982. **156**(6): p. 1780-93.
201. Sallusto, F., *The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses*. *Haematologica*, 1999. **84 Suppl EHA-4**: p. 28-31.
202. Senik, A., Stefanos, S., Kolb, J.P. et al., *Enhancement of mouse natural killer cell activity by type II interferon*. *Ann Immunol (Paris)*, 1980. **131C**(3): p. 349-61.
203. Robertson, M.J., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells*. *J Leukoc Biol*, 2002. **71**(2): p. 173-83.
204. Martin-Fontecha, A., Thomsen, L.L., Brett, S. et al., *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(12): p. 1260-5.
205. Bousso, P., *T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(9): p. 675-84.
206. Martins, M.A., Silva, M.L., Eloi-Santos, S.M. et al., *Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination*. *Vaccine*, 2008. **26**(9): p. 1173-84.
207. Campbell, J.J., Qin, S., Unutmaz, D. et al., *Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire*. *J Immunol*, 2001. **166**(11): p. 6477-82.
208. Taub, D.D., Sayers, T.J., Carter, C.R. et al., *Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity*. *J Immunol*, 1995. **155**(8): p. 3877-88.
209. Drake, P.M., Gunn, M.D., Charo, I.F. et al., *Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56(bright) natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1alpha*. *J Exp Med*, 2001. **193**(10): p. 1199-212.
210. Romagnani, P., Annunziato, F., Lazzeri, E. et al., *Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alpha beta+ CD8+ single-positive T cells, TCR gamma delta+ T cells, and natural killer-type cells in human thymus*. *Blood*, 2001. **97**(3): p. 601-7.
211. Inngjerdigen, M., Damaj, B. and Maghazachi, A.A., *Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells*. *Blood*, 2001. **97**(2): p. 367-75.
212. Hallman, M., Ramet, M. and Ezekowitz, R.A., *Toll-like receptors as sensors of pathogens*. *Pediatr Res*, 2001. **50**(3): p. 315-21.
213. Cassatella, M.A., Meda, L., Gasperini, S. et al., *Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes*. *Eur J Immunol*, 1995. **25**(1): p. 1-5.

214. D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M. *et al.*, *Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells*. J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1387-98.
215. Barksby, H.E., Nile, C.J., Jaedicke, K.M. *et al.*, *Differential expression of immunoregulatory genes in monocytes in response to Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli lipopolysaccharide*. Clin Exp Immunol, 2009. **156**(3): p. 479-87.
216. Brough, D., Le Feuvre, R.A., Wheeler, R.D. *et al.*, *Ca²⁺ stores and Ca²⁺ entry differentially contribute to the release of IL-1 beta and IL-1 alpha from murine macrophages*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3029-36.
217. Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M. *et al.*, *Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes*. J Exp Med, 1989. **170**(3): p. 827-45.
218. Locksley, R.M., *Interleukin 12 in host defense against microbial pathogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(13): p. 5879-80.
219. Scott, P., *IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity*. Science, 1993. **260**(5107): p. 496-7.
220. Van Reeth, K., *Cytokines in the pathogenesis of influenza*. Vet Microbiol, 2000. **74**(1-2): p. 109-16.
221. Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S. *et al.*, *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(6): p. 313-26.
222. Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S. *et al.*, *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
223. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
224. Greenwood, J., Wang, Y. and Calder, V.L., *Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1*. off. Immunology, 1995. **86**(3): p. 408-15.
225. Lawson, C. and Wolf, S., *ICAM-1 signaling in endothelial cells*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 22-32.
226. Becker, J.C., Dummer, R., Hartmann, A.A. *et al.*, *Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity*. J Immunol, 1991. **147**(12): p. 4398-401.
227. Becker, J.C., Termeer, C., Schmidt, R.E. *et al.*, *Soluble intercellular adhesion molecule-1 inhibits MHC-restricted specific T cell/tumor interaction*. J Immunol, 1993. **151**(12): p. 7224-32.
228. Meyer, D.M., Dustin, M.L. and Carron, C.P., *Characterization of intercellular adhesion molecule-1 ectodomain (sICAM-1) as an inhibitor of lymphocyte function-associated molecule-1 interaction with ICAM-1*. J Immunol, 1995. **155**(7): p. 3578-84.
229. Rieckmann, P., Michel, U., Albrecht, M. *et al.*, *Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) block lymphocyte attachment to cerebral endothelial cells*. J Neuroimmunol, 1995. **60**(1-2): p. 9-15.
230. Lukacs, N.W., Strieter, R.M., Elner, V.M. *et al.*, *Intercellular adhesion molecule-1 mediates the expression of monocyte-derived MIP-1 alpha during monocyte-endothelial cell interactions*. Blood, 1994. **83**(5): p. 1174-8.
231. Van Severen, G.A., Shimizu, Y., Horgan, K.J. *et al.*, *The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells*. J Immunol, 1990. **144**(12): p. 4579-86.
232. McCabe, S.M., Riddle, L., Nakamura, G.R. *et al.*, *sICAM-1 enhances cytokine production stimulated by alloantigen*. Cell Immunol, 1993. **150**(2): p. 364-75.
233. Schmal, H., Czermak, B.J., Lentsch, A.B. *et al.*, *Soluble ICAM-1 activates lung macrophages and enhances lung injury*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3685-93.

234. Otto, V.I., Gloor, S.M., Frentzel, S. *et al.*, *The production of macrophage inflammatory protein-2 induced by soluble intercellular adhesion molecule-1 in mouse astrocytes is mediated by src tyrosine kinases and p42/44 mitogen-activated protein kinase.* J Neurochem, 2002. **80**(5): p. 824-34.
235. Otto, V.I., Heinzl-Pleines, U.E., Gloor, S.M. *et al.*, *sICAM-1 and TNF-alpha induce MIP-2 with distinct kinetics in astrocytes and brain microvascular endothelial cells.* J Neurosci Res, 2000. **60**(6): p. 733-42.
236. Khongphatthanayothin, A., Phumaphuti, P., Thongchaiprasit, K. *et al.*, *Serum levels of sICAM-1 and sE-selectin in patients with dengue virus infection.* Jpn J Infect Dis, 2006. **59**(3): p. 186-8.
237. Kohn, E.C., Jacobs, W., Kim, Y.S. *et al.*, *Calcium influx modulates expression of matrix metalloproteinase-2 (72-kDa type IV collagenase, gelatinase A).* J Biol Chem, 1994. **269**(34): p. 21505-11.
238. Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K. *et al.*, *Matrix metalloproteinases: a review.* Crit Rev Oral Biol Med, 1993. **4**(2): p. 197-250.
239. Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A. and Kleiner, D.E., Jr., *Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.* FASEB J, 1993. **7**(15): p. 1434-41.
240. Freije, J.M., Diez-Itza, I., Balbin, M. *et al.*, *Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas.* J Biol Chem, 1994. **269**(24): p. 16766-73.
241. Elkington, P.T., O'Kane, C.M. and Friedland, J.S., *The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease.* Clin Exp Immunol, 2005. **142**(1): p. 12-20.
242. Brenner, D.A., O'Hara, M., Angel, P. *et al.*, *Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha.* Nature, 1989. **337**(6208): p. 661-3.
243. Unemori, E.N., Hibbs, M.S. and Amento, E.P., *Constitutive expression of a 92-kD gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines.* J Clin Invest, 1991. **88**(5): p. 1656-62.
244. Wahl, L.M., Corcoran, M.E., Mergenhagen, S.E. *et al.*, *Inhibition of phospholipase activity in human monocytes by IFN-gamma blocks endogenous prostaglandin E2-dependent collagenase production.* J Immunol, 1990. **144**(9): p. 3518-22.
245. Moura, A.S., Carmo, R.A., Teixeira, A.L. *et al.*, *Soluble inflammatory markers as predictors of liver histological changes in patients with chronic hepatitis C virus infection.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(9): p. 1153-61.
246. Lantz, M., Gullberg, U., Nilsson, E. *et al.*, *Characterization in vitro of a human tumor necrosis factor-binding protein. A soluble form of a tumor necrosis factor receptor.* J Clin Invest, 1990. **86**(5): p. 1396-1402.
247. Porteu, F. and Nathan, C., *Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils.* J Exp Med, 1990. **172**(2): p. 599-607.
248. Porteu, F., Brockhaus, M., Wallach, D. *et al.*, *Human neutrophil elastase releases a ligand-binding fragment from the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Comparison with the proteolytic activity responsible for shedding of TNF receptors from stimulated neutrophils.* J Biol Chem, 1991. **266**(28): p. 18846-53.
249. Lien, E., Liabakk, N.B., Johnsen, A.C. *et al.*, *Polymorphonuclear granulocytes enhance lipopolysaccharide-induced soluble p75 tumor necrosis factor receptor release from mononuclear cells.* Eur J Immunol, 1995. **25**(9): p. 2714-7.
250. Joyce, D.A., Gibbons, D.P., Green, P. *et al.*, *Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes.* Eur J Immunol, 1994. **24**(11): p. 2699-705.
251. Lantz, M., Malik, S., Slevin, M.L. *et al.*, *Infusion of tumor necrosis factor (TNF) causes an increase in circulating TNF-binding protein in humans.* Cytokine, 1990. **2**(6): p. 402-6.

-
252. Van Zee, K.J., Kohno, T., Fischer, E. *et al.*, *Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(11): p. 4845-9.
253. Rodriguez-Ramos, C., Galan, F., Diaz, F. *et al.*, *Expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of spontaneous bacterial peritonitis*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(8): p. 1668-76.
254. Furst, D.E., Wallis, R., Broder, M. *et al.*, *Tumor necrosis factor antagonists: different kinetics and/or mechanisms of action may explain differences in the risk for developing granulomatous infection*. Semin Arthritis Rheum, 2006. **36**(3): p. 159-67.
255. Lantz, M., Bjornberg, F., Olsson, I. *et al.*, *Adherence of neutrophils induces release of soluble tumor necrosis factor receptor forms*. J Immunol, 1994. **152**(3): p. 1362-9.
256. McIntyre, G.J. and Fanning, G.C., *Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors*. BMC Biotechnol, 2006. **6**: p. 1.
257. Yang, Y., Wu, C., Wu, J. *et al.*, *Inhibition of West Nile Virus replication by retrovirus-delivered small interfering RNA in human neuroblastoma cells*. J Med Virol, 2008. **80**(5): p. 930-6.
258. Ong, S.P., Chu, J.J. and Ng, M.L., *Inhibition of West Nile virus replication in cells stably transfected with vector-based shRNA expression system*. Virus Res, 2008. **135**(2): p. 292-7.
259. Haasnoot, J. and Berkhout, B., *RNA interference: its use as antiviral therapy*. Handb Exp Pharmacol, 2006(173): p. 117-50.
260. Williams, B.R., *Signal integration via PKR*. Sci STKE, 2001. **2001**(89): p. re2.
261. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. *et al.*, *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
262. Andrade, F., *Non-cytotoxic antiviral activities of granzymes in the context of the immune antiviral state*. Immunol Rev, 2010. **235**(1): p. 128-46.
263. Bitko, V. and Barik, S., *Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses*. BMC Microbiol, 2001. **1**: p. 34.
264. Kapadia, S.B., Brideau-Andersen, A. and Chisari, F.V., *Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 2014-8.
265. Bumcrot, D., Manoharan, M., Koteliansky, V. *et al.*, *RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(12): p. 711-9.
266. Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B. *et al.*, *Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 173-8.
267. Kim, D.H. and Rossi, J.J., *Strategies for silencing human disease using RNA interference*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(3): p. 173-84.
268. Song, E., Zhu, P., Lee, S.K. *et al.*, *Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(6): p. 709-17.
269. Morris, K.V. and Rossi, J.J., *Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy*. Gene Ther, 2006. **13**(6): p. 553-8.
270. Akhtar, S. and Benter, I.F., *Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3623-32.