

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. A. Rethwilm

**Untersuchung zur Populationsdynamik und
Effektorfunktionen peripherer Blutzellen im Verlauf einer
Masern-Erkrankung bzw. nach Vakzinierung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Claudia BREER
aus Osnabrück

Würzburg, Juni 2007

Referentin: Prof. Dr. S. Schneider-Schaulies

Koreferent: Prof. Dr. A. Rethwilm

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.5.2007

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 MASERNVIRUS.....	2
1.2 PATHOGENESE.....	2
1.3 IMMUNREAKTION.....	3
1.3.1 Rolle der γ/δ -T-Zellen bei der Immunreaktion.....	4
1.3.2 Toll ähnliche Rezeptoren (TLRs).....	5
1.4 IMMUNSUPPRESSION.....	6
1.5 IMPFUNG.....	7
2. MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1 MATERIAL.....	10
2.1.1 Zellen und Serum.....	10
2.1.2 Antikörper.....	10
2.1.3 Medien für Zellkultur.....	11
2.1.4 Chemikalien.....	11
2.1.5 Radioaktiv markierte Verbindungen.....	12
2.1.6 Medien für Kits, Lösungen und Puffer.....	12
2.1.7 Verbrauchsmaterial.....	12
2.1.8 Geräte.....	13
2.2 METHODEN.....	13
2.2.1 Zellkultur.....	13
2.2.1.1 Zellkultur von Suspensionszellen	13
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	13
2.2.1.3 Isolierung von primären humanen mononukleären Zellen aus peripherem Blut.....	14
2.2.2 Aufreinigung monoklonaler Antikörper.....	14
2.2.3 Durchflusszytometrie.....	14
2.2.3.1 FACS-Oberflächenfärbungen.....	15
2.2.3.2 Intrazelluläre FACS- Färbungen.....	15
2.2.3.3 Populationsuntersuchungen.....	15

2.2.4 Proliferationstests.....	16
2.2.4.1 Mitogene Stimulation von T-Zellen.....	16
2.2.4.2 T-Zell Expansion nach Stimulation mit IL-2+IPP.....	17
2.2.5 Stimulation von Monozyten mit LPS und PamCSK.....	17
2.2.6 Zytokinbestimmung über ELISA.....	18
2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot.....	18
2.2.7.1 Herstellung von Zelllysaten.....	18
2.2.7.2 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese.....	19
2.2.7.3 Western Blot – Analyse.....	20
2.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	21
3. ERGEBNISSE.....	22
3.1 SUBPOPULATIONEN VON „PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS“ (PBMC): FLUKTUATIONEN IM VERLAUF EINER MASERN-INFEKTION BZW. NACH EINER VAKZINIERUNG.....	22
3.1.1. Subpopulationen von PBMC.....	22
3.1.2 Zusammensetzung des PBMC-Kompartiments im Verlauf einer Masern-Infektion.....	23
3.1.3 Zusammensetzung des PBMC-Kompartiments nach einer Masern-Impfung.....	26
3.2 WERDEN IM VERLAUF DER ERKRANKUNG ODER NACH EINER VAKZINIERUNG ADHÄSIONSMOLEKÜLE AUF T-ZELLEN MODULIERT?.....	29
3.2.1 Akutpatienten.....	30
3.2.2 Probanden nach Impfung.....	31
3.3 NACHWEIS VON OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN AKTIVIERTER T-ZELLEN.....	34
3.3.1 Akutpatienten.....	34
3.3.2 Impflinge	36
3.4 KONZENTRATION VON TYP1-INTERFERON (TYP1-IFN) BEI MASERNPATIENTEN UND NACH VAKZINIERUNG.....	39
3.5 PROLIFERATIONSFÄHIGKEIT VON T-ZELLEN NACH MASERNVIRUSINFEKTION bzw. NACH MASERN-VAKZINIERUNG	41

3.5.1. Proliferationsfähigkeit der α/β -T-Zellen.....	41
3.5.2. Proliferationsfähigkeit von γ/δ -T-Zellen.....	43
3.6 <i>IN VITRO</i> RE-STIMULATION VON MONOZYTEN.....	45
3.7 FREQUENZ REGULATORISCHER T-ZELLEN IM VERLAUF EINER MASERNINFEKTION bzw. NACH VAKZINIERUNG.....	47
4. DISKUSSION.....	50
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	56
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	66
7. ABKÜRZUNGEN.....	68

1. Einleitung

Masern ist eine hochansteckende Krankheit, die meist im Kindesalter auftritt. Sie wurde als „the greatest killer of children in history“ bezeichnet (<http://www.emedicine.com>). Aufgrund der flächendeckenden Impfungen konnte in der industrialisierten Welt die Erkrankungsrate einer Masernvirusinfektion bzw. deren Komplikationen deutlich reduziert werden. Diese Situation stellt sich in den Entwicklungsländern ganz anders dar. Dort sind die maserninduzierten Krankheitsfälle und deren Folgen die Ursache für mehr als eine halbe Million Tote pro Jahr (WHO, 2003). Als Gründe dafür sind einerseits die unzureichende medizinische Versorgung, insbesondere der fehlende Zugang zu regelmässigen Impfungen, andererseits auch die Mangelernährung und Hygiene zu nennen. Diese Problematik besteht jedoch auch bei anderen infektiösen Erkrankungen. Eine Besonderheit der Masernerkrankung ergibt sich aus der Induktion einer transienten Immunsuppression.

Das Phänomen der virus-induzierten Immunsuppression ist nicht nur beim Masernvirus (MV) bekannt, sondern besonders intensiv auch für das „human immunodeficiency virus“ (HIV) untersucht worden (Oldstone, 1996). Dass die Masernerkrankung mit einer generellen Suppression des Immunsystems einhergeht, wurde erstmals 1908 von Pirquet beschrieben; er hatte beobachtet, dass im Verlauf einer akuten MV-Infektion der Tuberkulin-Hauttest unmittelbar vor dem Auftreten des Hautausschlages für die Dauer von 1-2 Monaten deutlich reduziert war (Pirquet, 1908). Aufgrund seiner immunsupprimierenden Aktivität wurde MV exemplarisch sogar für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen therapeutisch genutzt (Blumberg & Cassady, 1947). Es ist die ausgeprägte Hemmung des Immunsystems und die dadurch bedingte Anfälligkeit für Sekundärinfektionen, die als Hauptursache für die hohe Mortalität und die hohe Morbidität von MV-Infektionen gilt. Dies ist umso alarmierender, als bereits vor mehr als 30 Jahren ein effektiver Impfstoff entwickelt wurde. Die nach Vakzinierung mit attenuiertem MV ablaufenden immunologischen Veränderungen sind weit weniger ausgeprägt (Hussey, 1996) und somit mit deutlich weniger schwerwiegenden Konsequenzen assoziiert. Trotz großer Fortschritte hinsichtlich eines Verständnisses der zellulären und molekularen Grundlagen der MV-induzierten Immunreaktionen und der

Immunsuppression sind wichtige Aspekte noch ungeklärt (Schneider-Schaulies & ter Meulen, 2002; Rall, 2003).

1.1 Masernvirus

Das Masernvirus (MV) ist das einzige humanpathogene Mitglied der Gattung Morbillivirus, die zur Familie der Paramyxoviridae gehört (Fields, 1990). Das pleomorphe MV-partikel hat einen Durchmesser von 100-250 nm. Es besteht aus einem RNA-Strang sowie sechs Strukturproteinen. Drei dieser Proteine sind mit der viralen RNA komplexiert und bilden das Nukleokapsid, die anderen drei bilden die Virus-Hülle. Bei den Nukleokapsid-Proteinen handelt es sich um das N-Protein (Nukleoprotein), das die einzelsträngige RNA bindet, sowie das L (large) -Protein und das P (phospho) -Protein, die zusammen die RNA-Polymerase bilden. Die Virus-Hülle enthält das stark basische M (matrix) -Protein als verbindendes Element zwischen Nucleocapsid und der „Lipidmembran“; außerdem das H (hemagglutinin) -Glykoprotein, das für die Assoziation des Virus an die Zellmembran verantwortlich ist, und das F (fusion) -Protein, ein Glycoprotein, welches die Fusion von Virus und Wirtszelle ermöglicht. Bei der Virus/Zell-Interaktion bindet das virale H-Protein an zelluläre Rezeptorproteine, CD 46 (Naniche, 1993; Doerig, 1993) oder CD 150 (Tatsuo, 2000). Man geht davon aus, dass als Folge eine Konformationsänderung des oligomeren F₁-F₂-Komplexes auftritt, die es dem Virus ermöglicht, die Fusion zu vollenden (Joshi, 1998; Samuel & Shai, 2001).

1.2 Pathogenese

Das Masernvirus wird per Tröpfcheninfektion übertragen und infiziert zunächst das respiratorische Epithel. Dort kommt es zur primären Replikation des Virus (Riley et al, 1978) und anschließend zu einer Infektion von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs). Infolge der Leukozyten-Wanderung gelangen die infizierten Zellen in die lymphatischen Organe; dort kommt es zu einer starken Replikation. Eine primäre Virämie, 2-3 Tage nach der initialen Exposition, und eine sekundäre Virämie, ca 7 Tage später, resultieren in der Etablierung einer generellen Masern-Infektion. Während einer Inkubationszeit von 10-14 Tagen ist die Viren-Konzentration im Blut und damit auch die Infektiosität am höchsten. Das klinische Bild der akuten Erkrankung umfaßt einen länger als 3 Tage anhaltenden generalisierten Ausschlag (makulopapulös) und Fieber $\geq 38,5$ °C sowie mindestens eines der folgenden Symptome: Husten, Katarrh (wässriger

Schnupfen), Kopliksche Flecken, Konjunktivitis. Als labordiagnostischen Nachweis gilt ein positiver Befund durch mindestens eines der nachfolgend aufgeführten Analyse-Verfahren: Virusisolierung (aus Zellen des Nasen-Rachen-Raums, Konjunktiven, Urin oder Blut (Enders, 1962)), Nukleinsäure-Nachweis (z.B. PCR), IgM-Antikörper-Nachweis (z.B. ELISA), IgG-Antikörper-Nachweis (\geq 4-facher Titeranstieg, z.B. NT, HHT, ELISA). Nach Abklingen des Exanthems ist die akute Erkrankung überstanden. Es bleibt jedoch noch über einige Monate hinweg eine Immunsuppression bestehen. Im Rahmen der Abwehrschwäche kann es zu Sekundärinfektionen kommen z.B. Pneumonie, Diarrhöe und Otitis media (Clements und Cutts, 1995). Als weitere Komplikationen sind eine vom MV induzierte Autoimmunreaktion gegen das Myelinprotein im ZNS (Enzephalitiden) und die relativ seltene Spätfolge der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE) beschrieben worden (Schneider-Schaulies et al. 1991). Erkrankte Personen sollten in der akuten Krankheitsphase Bettruhe einhalten. Eine spezifische antivirale Therapie gibt es nicht. Die symptomatische Therapie ist abhängig von den Organmanifestationen. Neben fiebersenkenden Medikamenten und Antitussiva ist bei bakteriellen Superinfektionen, z.B. Otitis media und Pneumonie, eine antibiotische Therapie indiziert (RKI, 2004)

1.3 Immun-Reaktionen

Als erste Antwort auf eine Infektion werden im Körper die unspezifischen Abwehrmechanismen aktiviert. Dabei produzieren infizierte Zellen Zytokine, die dazu beitragen, phagozytierende Zellen (Granulozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, natürliche Killerzellen) chemotaktisch an den Infektionsort zu leiten. Professionelle antigen-präsentierende Zellen (APC), wie die blutständigen Monozyten und gewebeständigen Makrophagen, zeichnen sich durch Phagozytose körperfremder Strukturen aus. Durch MHC-I/-II abhängige Präsentation der Antigene auf ihrer Oberfläche und Zytokin-Sekretion können antigen-präsentierende Zellen eine Lymphozyten-Aktivierung auslösen. Natürliche Killerzellen werden durch Interleukin 12 (IL-12) aktiviert und zeichnen sich durch die frühe Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) aus. Dendritische Zellen (DC) spielen als einzige APC eine maßgebliche Rolle sowohl bei der Induktion und Polarisierung der naiven T-Zell-Antwort als auch der Gedächtnis-Antwort (Banchereau und Steinman, 1998).

Zur Charakterisierung und Unterscheidung verschiedener Subpopulationen von mononukleären Blutzellen bedient man sich einer Reihe spezieller Oberflächenproteine,

die linien- oder differenzierungsspezifisch mit einer Gruppe (Cluster) von monoklonalen Antikörpern reagieren. Sie werden als Mitglied eines „Clusters of Differentiation“ (CD) bezeichnet. Das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von spezifischen Oberflächen-Markern erlaubt die Separierung und Isolierung distinkter Zellpopulation, z.B. mittels „fluorescence activated cell sorting“ (FACS). Während die $\alpha\beta$ -T-Zellen durch die Expression von CD3, CD4 bzw CD8 gekennzeichnet sind, gilt CD16 als charakterischer Marker für natürliche Killerzellen. Die Monozyten/Makrophagen weisen CD14 bzw F4/80 als Zell-Lineage Marker auf. Zum unspezifischen Immunsystem gehört auch eine kleine (ca. 5%) Subpopulation der T-Zellen; diesen γ/δ -T-Zellen fehlen die charakteristischen CD4- bzw. CD8-Marker der $\alpha\beta$ -T-Zellen. Sie spielen bei der frühen Antigen-Erkennung und Immunantwort eine wichtige Rolle (Carding & Egan, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass APC und γ/δ -T-Zellen sogenannte Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR) auf ihrer Oberfläche tragen, die bei verschiedenen viralen Infektionen als Effektoren der angeborenen Immunantwort antigenspezifische Reaktionen modulieren können. Neben den zellulären Reaktionen kommt es auch zu einer Freisetzung von Typ 1 Interferon (Typ1 IFN), das antivirale Wirkung aufweist und zum Schutz des umgebenden Gewebes beiträgt.

Mit dem Auftreten der klinischen Symptome korreliert der Beginn einer spezifischen Immunantwort, d.h. das Auftreten von virus-spezifischen T-Zellen und Antikörpern. Die T-Zellaktivierung spiegelt sich wider in erhöhten Plasmakonzentrationen von löslichen T-Zellproteine (CD4, CD8, IL-2R, β 2-Mikroglobulin) aber auch von IL-2 und IFN- γ , charakteristische Zytokine für T-Helfer1 (Th1) -Zellen (Griffin, 1989, 1990, 1992). Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Veränderung des Zytokin-Musters, insbesondere zu einer erhöhten Konzentration von IL-4, die für mehrere Wochen erhalten bleibt; IL-4 wird von Th2-Zellen generiert (Griffin, 1993, 1995; Schneider-Schaulies, 2001; Schnorr, 2001). Insgesamt wird im Verlauf der akuten Maserninfektion eine effiziente und langwirksame virus-spezifische Immunität entwickelt, die vor Re-Infektionen schützt.

1.3.1 Rolle der γ/δ -T-Zellen bei der Immunreaktion

Neben den $\alpha\beta$ -T-Zellen, die den größten Teil der T-Zellen ausmachen und Teil der adaptiven Immunreaktion sind, existieren sogenannte γ/δ -T-Zellen, die den γ/δ -T-Zell Rezeptor (TCR) exprimieren und zur unspezifischen Immunreaktion beitragen. Sie sind zur Antigen-Erkennung nicht auf MHC-Proteine angewiesen, sondern reagieren auf von

infizierten Zellen freigesetzte „Stressproteine“ (De Libero, 1997) und Phosphoantigene. Ein Beispiel aus der Gruppe der Phosphoantigene ist das Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP). Entsprechend wird IPP genutzt für eine selektive Expansion von $\gamma\delta$ 2-T-Zellen, der am häufigsten auftretenden Variante von γ/δ -T-Zellen im peripheren Blut beim Erwachsenen (Wesch, 1997).

Bei viralen Infekten kommt es zu einer Akkumulation von γ/δ -T-Zellen am Ort der Infektion. Dieses Phänomen wurde unter anderem für das HIV-1 (Autran, 89, de Maria, 92, de Paoli 91), das Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) (Bukowski, 94, Maccario, 93), das Cytomegalievirus (CMV) (Lafarge 01) und Epstein-Barr Virus (EBV) (de Paoli, 90) beschrieben. Die genaue Funktion dieser Zellen am Infektionsort ist noch nicht bekannt; es wird jedoch vermutet, dass sie vorwiegend immunmodulierend wirken. γ/δ -T-Zellen produzieren im aktivierten Zustand neben dem für die Ausreifung von dendritischen Zellen (DCs) wichtigen Faktor Granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) auch die typischen T-Zell Zytokine IL-4, -5 und IFN- γ , sowie proinflammatorische Mediatoren, wie TNF- α und NO (DeLibero, 1997). Darüber hinaus wird den γ/δ -T-Zellen eine Beteiligung bei der Termination der Immunreaktion durch die Induktion einer Apoptose bei aktivierten T-Zellen zugeschrieben (Kaufmann, 1996).

1.3.2 Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs)

Toll-Rezeptoren wurden zuerst bei *Drosophila* beschrieben und anschließend wurden Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR) bei vielen anderen Spezies entdeckt. Sie erkennen offenbar „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMP) (Akira, 2001; Medzhitov, 2001). Bisher konnten bisher 10 verschiedene TLR identifiziert werden. TLR-Aktivierung durch virale Proteine konnte beschrieben werden, z.B. von TLR4 bei Kontakt mit dem F Protein des RSV (Kurt-Jones, 2000) oder von TLR2 bei Kontakt mit dem H Protein des MV (Bieback, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschliesslich TLR2 und 4 untersucht. Diese werden hauptsächlich auf APC exprimiert und interagieren u.a. mit bakteriellen Zellwandbestandteilen wie LPS oder SAC. Nach Bindung an TLRs, extrazelluläre IL-1-Homologe, werden intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt, welche schliesslich eine Expression von proinflammatorischen Zytokine auslösen, z.B. IL-6, das zur Induktion einer spezifischen Immunantwort beiträgt.

1.4 Immunsuppression

Obwohl im Verlauf einer Masernvirusinfektion ein effektiver und spezifischer Immunschutz generiert wird, kommt es paradoxerweise gleichzeitig zu einer vorübergehenden generellen Suppression der Immunreaktion gegenüber sekundären Infektionen z.B. Pneumonien, Otitiden oder Enzephalitiden bzw einer Reaktivierung von Tuberkulose (Tamashiro, 1987). Wie es zur Unterdrückung der Immunabwehr kommt ist noch nicht geklärt. Jüngste Studien haben wichtige Einblicke in die zugrunde liegende Mechanismen erlaubt, die im Hinblick auf ein Verständnis der virus-induzierten Fehlregulation des Immunsystems von zentraler Bedeutung sind. Ein Kennzeichen der MV-induzierten Immunsuppression ist eine hochgradige Leukopenie, von der vorrangig die T-Zell Population betroffen ist. Als Ursachen werden erhöhte Apoptose-Raten der Lymphozyten (Addae, 1995; Okada, 2000) oder ein verändertes Migrationsverhalten der T-Zellen (Nanan, 1999) diskutiert. Desweiteren ist die in *ex vivo* Experimenten beobachtete Inhibition der Lymphozyten-Proliferation von besonderem Interesse (Schneider-Schaulies & ter Meulen, 1999). Aufgrund der relativ niedrigen Anzahl MV-infizierter mononukleärer Zellen im peripheren Blut und der Beobachtung, dass MV-infizierte Zellen in der Lage sind auch die Proliferationsfähigkeit von nicht-infizierten Zellen zu blockieren (Schlender, 1996), geht man davon aus, dass die Immunsuppression auf indirekte Mechanismen zurückzuführen ist. Dabei wäre es vorstellbar, dass infizierte Zellen inhibitorische Faktoren produzieren, die autokrin oder parakrin wirken. Für diese These sprechen Befunde, die eine inhibitorische Wirkung der Überstände MV-infizierter Zellen auf die Proliferation von T-Zellen aufzeigen (Sun, 1998; Fujinami, 1998), obwohl entsprechende Faktoren bisher noch nicht identifiziert werden konnten. Eine alternative Möglichkeit der Zell-Kommunikation besteht auf der Ebene der Zell-Zell-Kontakte bei Oberflächen-Interaktionen zwischen den wenigen infizierten Zellen und nicht-infizierten Zellen. Dies könnte negative Signale in Lymphozyten generieren und dadurch der Proliferationsblock induziert werden (Sanchez-Lanier, 1988; Yanagi, 1992). Die Zellen reagieren mit einer Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase. Diese Reaktion geht mit einer De-Regulation der Zellzyklusproteine einher (Schnorr, 1997; Engelking, 1999). Auslöser für die kontakt-vermittelte Inhibition der Proliferation von Lymphozyten sind offenbar auf der Oberfläche von infizierten Zellen exprimierte Hüllproteine des Masernvirus. Diese These wird durch die neutralisierende Wirkung von anti-MV-Antikörpern bezüglich des Proliferationsarrests gestützt (Yanagi, 1992)

insbesondere aber durch die Befunde, dass die MV-Glycoproteine (F-H Komplex) selbst eine Blockierung der proliferativen Reaktion hämatopoetischer Zelllinien auf polyklonale Stimulationen vermittelt (Schlender, 1996; Niewiesk, 1997). Diese inhibitorische Wirkung der Glycoproteine F und H ist unabhängig von ihrer fusogenen Aktivität (Weidmann, 2000) und resultiert daher offenbar aus einer Interaktion mit „Rezeptoren“ auf der Oberfläche von Immunzellen. Es sind jedoch weder CD46 noch CD150 an der Vermittlung des Proliferationsarrests beteiligt. Die Identität des Rezeptors ist noch nicht bekannt; neuere Befunde sprechen aber für eine Beteiligung von rezeptor-vermittelten Signalen an der Regulation von komplexen Signalwegen, insbesondere des „IL-2R Pathways“. Es hat sich gezeigt, dass nach MV Kontakt die IL-2-abhängige Aktivierung der Akt-Kinase unterbleibt (Avota, 2001). Diese Kinase reguliert die Aktivität vieler bedeutender „downstream targets“ und gilt als bedeutsamer Schalter für die Kontrolle von Überlebenssignalen in vielen Zelltypen, in T-Zellen ist sie wichtig für die Zellzyklusprogression. Damit interferiert der MV mit einem Signalweg dem hinsichtlich des Überlebens und der funktionellen Differenzierung von T-Zellen zentrale Bedeutung zukommt (Smith, 1988).

Zur Beendigung einer Immunreaktion bzw zur Vermeidung von überschüssenden Immunreaktionen werden frühzeitig Mechanismen durch die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) eingeleitet (Vahlenkamp et al, 2005). Bisher konnte gezeigt werden, dass bei Infektionen z.B. mit *Leishmania major*, die $CD4^+/CD25^+$ T-Zellen zur Kontrolle der Eliminierung bzw. Persistenz des Erregers beitragen. (Belkaid et al, 2002). Andere Untersuchungen sprechen dafür, dass T_{reg} -Zellen bei Autoimmunerkrankungen (Karandikar et al., 1996, Perrin et al., 1996, Luhder et al., 1998), Tumorstadium (Leach et al., 1996) und Toleranzentwicklungen (Perez, 1997) eine wichtige Rolle spielen.

1.5 Impfung

Die Schutzimpfung ist die bedeutendste präventive Maßnahme gegen Masern. Weil der Mensch einziger Wirt des Virus und der Erreger antigenisch weitgehend stabil ist, wäre mit dem zur Verfügung stehenden Impfstoff eine wirksame Prävention bis hin zur weltweiten Elimination möglich. Seit 1984 ist daher die Elimination der Masern durch Impfprogramme ein wesentliches gesundheitspolitisches Ziel der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Durch groß angelegte Impfkampagnen, die die regulären Impfprogramme ergänzen, wurden im Weltmaßstab bereits deutliche Erfolge

erzielt. Anfang der 90er Jahre wurde in vielen europäischen Ländern eine drastische Reduktion der Morbidität und Mortalität erreicht.

Bei dem Impfstoff handelt es sich um einen Lebendvirusimpfstoff, hergestellt aus abgeschwächten Masernviren, die auf Hühnerfibroblasten vermehrt werden. Die Impfstoffe werden als Monovakzine und in kombinierter Zusammensetzung mit Mumpsvirus sowie Mumps- und Rötelnvirus angeboten (MMR-Vakzine). Letzterer gilt als Impfstoff der Wahl.

Die Erstimpfung sollte im Alter von 11–14 Monaten, d.h. nach dem Verschwinden der maternalen Antikörper, erfolgen. Die in Deutschland zugelassenen Impfstoffe bewirken bei über 90 % der einmal Geimpften eine Serokonversion. Bis zu 5 % der Impflinge zeigen ein mildes klinisches Bild mit mäßigem Fieber, flüchtigem Exanthem und respiratorischen Symptomen, meist in der 2. Woche nach der Impfung. Die durch die Impfung bewirkte Immunantwort ist nach 4–6 Wochen nachweisbar. Die mittleren Antikörpertiter liegen niedriger als nach natürlicher Infektion. Bei Kindern, die nach der Erstimpfung keine Impfmunität entwickelt haben, wird eine Zweitimpfung empfohlen um ein Maximum der Impfmunität zu sichern. Die zweite MMR-Impfung kann 4 Wochen nach der ersten MMR-Impfung erfolgen. Auffrischungen sind alle 10 Jahre empfohlen. Entsprechend den Impfempfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut sollte eine Impfung – vorzugsweise mit MMR-Impfstoff – auch bei allen ungeimpften und noch nicht erkrankten Personen in medizinischen Einrichtungen zur Behandlung von Kindern sowie in Kindertagesstätten, Kinderheimen u.ä. durchgeführt werden. Kontraindikationen bestehen bei maligner Vorerkrankung, Behandlung mit Chemotherapie oder Radiatio, bzw unter hochdosierter Kortikosteroidtherapie. Auch Allergien auf Proteine im Hühnerei oder Gelatine schliessen eine Impfung aus (Duclos and Ward, 1998). Bei HIV-Infektion besteht generell keine Kontraindikation zur Masernimpfung (Moss 1999, 2003).

Klinische Erfahrung zeigt, daß nach einer Masernimpfung eine deutlich schwächere Immunreaktion als bei einer Akuterkrankung auftritt. Die immunologischen Mechanismen sind allerdings noch nicht eindeutig.

Die Fortschritte bei der Erforschung von zellulären und molekularen Prozesse bei der spezifischen Immunreaktion und der nachfolgenden Immunsuppression bei einer Infektion mit dem Masernvirus haben nicht nur zu einem besseren Verständnis der komplexen Abläufe beigetragen, sondern auch die Möglichkeit eröffnet, eine Vielzahl

von Parametern und molekularen Markern für vergleichende analytische und diagnostische Ansätze zu verwenden.

Die meisten Daten zur Frage der Interaktion des Masernvirus mit dem angeborenen bzw adaptiven Immunsystems wurden bisher *in vitro* erhoben. Des weiteren existieren nur wenige Studien über die Immunreaktion nach Impfung mit dem (MMR)- Impfstoff. Im Rahmen dieser Studie sollen mit Hilfe von klinischem Material (*ex vivo*) die Reaktion verschiedener Parameter des unspezifischen und des spezifischen Immunsystems bei einer akuten Masernvirus-Infektion und einer Masern-Vakzinierung vergleichend untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen und Serum

Blutzellen und Serumproben von Masernpatienten und Impfungen wurden von der Kinderklinik der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

Die Kontrollzellen wurden von 14 gesunden Labormitarbeitern bzw. Blutspendern bereitgestellt. Sie waren zwischen 18 und 47 Jahre alt, 5 weiblich/ 7 männlich (2 unbekannt). Alle Labormitarbeiter waren mindestens einmal maserngeimpft. Es gibt keine Angaben über Leukozytenzahlen oder Antikörperstatus.

Bei den Masernpatienten wurden 31 Zellproben von 22 Patienten untersucht. Sie waren zwischen 3 und 29 Jahre alt (3 unbekannt), 5 weiblich/ 14 männlich. Teilweise konnten serielle Proben untersucht werden, teilweise Einzelproben. Bei 15 Patienten wurden Antikörperuntersuchungen gemacht. Es konnte bei allen eine Serokonversion festgestellt werden (HHT-titer, IgM, IgG positiv).

Ausserdem wurden 7 Impfungen mit seriellen Proben analysiert, 22-27 Jahre alt (2 unbekannt), 2 weiblich, 5 männlich. Als Impfstoff wurde teilweise Masern Lebendimpfstoff von Behring verwendet bzw. Masern-Mumps-Röteln (MMR)-Impfstoff. Es wurden vergleichbar viele Leukozyten gewonnen; wie bei den Kontrollpersonen. Bei allen Probanden konnte im Verlauf der Untersuchung eine Serokonversion beobachtet werden.

Serumproben, teilweise auch seriell, gab es von 6 der Impfungen (12 Proben) und 20 der Patienten (46 Proben).

5 Proben von 3 Mumpspatienten wurden untersucht. Sie waren zwischen 14 und 27 Jahren alt. Bei allen konnten im Verlauf der Erkrankung Antikörper nachgewiesen werden.

Die verwendeten BJAB (humane lymphoblastoide B-Zelllinie) waren im Labor verfügbar (Menezes, 1975)

2.1.2 Antikörper

Der gegen humanes MxA-Protein gerichtete monoklonale Antikörper war im Institut verfügbar.

2. Material und Methoden

Folgende direkt gekoppelten Antikörper wurden in der Durchflusszytometrie eingesetzt:

Antikörperspezifität	Klonbezeichnung	Isotyp	Konjugat	Hersteller
CD 3	UCHT 1	Maus IgG ₁	FITC / PE	Immunotech
CD 11a	G43-25B	Maus IgG _{2b}	PE	Immunotech
CD 11c	B-ly 6	Maus IgG ₁	PE	Immunotech
CD 14	RMO 52	Maus IgG _{2a}	FITC	Immunotech
CD 16	3G8	Maus IgG ₁	PE	Immunotech
CD 19	J4.119	Maus IgG ₁	FITC	Immunotech
CD 25	MA 251	Maus IgG ₁	PE	Immunotech
CD 54	HA58	Maus IgG ₁	PE	Becton- Dickinson
CD 69	FN 50	Maus IgG ₁	PE	Becton- Dickinson
γ/δ -TCR	Immu 510	Maus IgG ₁	FITC / PC 5	Immunotech
HLA-DR	G46-6	Maus IgG _{2a}	PC 5	Becton- Dickinson
ILT 3	Z 113.8	Maus IgG ₁	PC 5	Immunotech

2.1.3 Medien für Zellkultur

Antibiotika

DMSO

FKS

NaHCO₃

Medienküche

Roth

Seromed

Medienküche

2.1.4. Chemikalien

Acrylamid

Bisacrylamid

BSA

Ficoll-Paque

IFN β

IL 2

IPP

Sigma

Sigma

Sigma

Pharmacia

Strathmann Biotech AG

Strathmann Biotech AG

Sigma

2. Material und Methoden

PHA	Sigma
Saponin	Sigma
Tween 20	Sigma
TEMED	Biorad
TRIZMA (Tris)	Sigma

2.1.5 Medien für radioaktiv markierte Verbindungen

[Methyl- ³ H]- Thymidin (5 Ci/mmol)	Amersham
--	----------

2.1.6 Medien für Kits, Lösungen und Puffer

Anodenpuffer 30mM	30mM Tris/HCl, 20% Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer 300mM	300mM Tris/HCl, 20% Methanol, pH 10,4
FACS-puffer	0,4% BSA, 0,025 NaN ₃ in Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem PBS, pH 7,4 IL 1 β , IL 4, IL 6, IL 12p40, IFN- γ , TNF- α DuoSet R&D Systems
Kathodenpuffer	39,6 mM 6-Amino-n-Hexansäure, 25 mM Tris/HCl, 20% (v/v) Methanol, pH 9,4
PBS/ Tween20	0,5% Tween in PBS
Proteingelpuffer (10x)	250mM Tris/HCl, 1,9 M Glycin, 1% (w/v) SDS, pH 8,7
Saponinpuffer	0,33% Saponin in FACS-Puffer, pH 7,4

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme	Kodak
Einmalküvetten	Roth
Einmalspritzen und – kanülen	Servopharma
FACS- Röhrchen	Elkay
3MM- Whatmanpapier	Schleicher & Schüll
Nitrocellulosematten	Schleicher & Schüll
Plastikmaterial für die Zellkultur	Greiner, Nunc, Falcon
Pipettenspitzen	Eppendorf, Roth
Röntgenfilme	Fuji Foto Film
Sterilfilter	Schleicher & Schüll

2.1.8 Geräte

Brutschrank	Heraeus
FACScan	Becton-Dickinson
FACScalibur	Becton-Dickinson
Flüssigkeitsszintillationszähler	Wallac
Gelelektrophoresekammern	Institutswerkstatt
Halbtrockenblottingapparatur	Institutswerkstatt
Mikroskop	Leitz
pH- Meter	WTW
Sterilwerkbank	Heraeus
Zellerntegerät	Wallac
Zentrifugen	Sorvall, Beckamm, Eppendorf

2.2 Methoden

2.2.1. Zellkultur

Alle Zellkulturen wurden in Zellkulturplastikflaschen oder Multilochplatten in Brutschränken bei 37°C in einer 5% CO₂-haltigen Atmosphäre gehalten. Die verwendeten Medien waren NaHCO₃ -gepuffert und mit Penicillin/Streptomycin versetzt.

2.2.1.1 Zellkultur von Suspensionszelllinien

BJAB Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FKS kultiviert.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zum Gebrauch wurden eingefrorene Zellsuspensionen schnell aufgetaut, mit einem Überschuss an Kulturmedium gewaschen und ausgesät.

Nach Gebrauch wurden 10⁶ bis 10⁷ Zellen in 2ml Einfriermedium (FKS/ 20% DMSO) resuspendiert und durch schrittweises Abkühlen (2h bei -20°C, über Nacht in -70°C und anschliessendem Transfer in flüssigen Stickstoff) schonend eingefroren.

2.2.1.3 Isolierung von primären humanen mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Als Quelle für PBMCs dienten „Buffy coats“ oder Leukapherese-Präparate gesunder Spender aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Universitätsklinik Würzburg. Diese Blutproben wurden mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS (Konzentration 1:2) verdünnt, auf einem 3ml Kissen Ficoll-Paque™ Plus geschichtet und bei Raumtemperatur für 30 min mit 400xg zentrifugiert. Das Ergebnis sind verschiedene zellhaltige Schichten aufgetrennt entsprechend ihrer Dichte. Die PBMC-Interphase wurde abgenommen und 3mal mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in RPMI mit 10% FKS kultiviert und gezählt. Nähere Angaben über Färbungen mit verschiedenen Antikörpern und die Auswertung per FACS-Analyse sind unter 2.2.3.1 und 2.2.3.3. zu finden.

2.2.2 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Hybridomzelllinien, die monoklonale Antikörper produzieren, welche gegen das zelluläre MxA-Protein gerichtet sind, wurden in RPMI 1640/10% FKS kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml wurden die Kulturen geerntet und der antikörperhaltige Überstand abgenommen und zentrifugiert (10min, 1000xg, 0-4°C). Durch mehrfache Ammoniumsulfatpräzipitation der Proteine (Zugabe von 15,8g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 50ml Überstand (15min, 0-4°C, 4.300xg), Zugabe von 15,8g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 50ml in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS resuspendiertes Protein (15min, 0-4°C, 4300xg), Zugabe von 15,8g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 50ml Überstand (15min, 0-4°C, 4.300xg)) wurden die Antikörper angereichert und durch Dialyse gegen $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freies PBS unter dreimaligem Pufferwechsel (48h, 4°C) entsalzt. Nach Abschluss der Dialyse wurde der angereicherte Antikörper steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Immunfluoreszenzfärbungen wurden in einem Becton-Dickinson FACS-Scan™ und FACS-Calibur™ unter Verwendung der LysisII™-Software aufgenommen und mittels der Cellquest-Software™ ausgewertet

2.2.3.1 Oberflächenfärbungen

Es wurden ca. 50000 Zellen pro Färbung eingesetzt. Diese wurden in einem Gesamtvolumen von 50µl mit den jeweiligen Antikörpern 30min auf Eis inkubiert. Die Antikörper wurden dabei in Verdünnungen eingesetzt, die den Angaben des Herstellers entsprechen. Im Fall der im Labor präparierten monoklonalen Antikörper wurde die optimale Konzentration durch Kontrollfärbungen festgestellt. Nach der Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Ansätze mit FACS-puffer gewaschen. Pro Färbung wurden 10000 morphologisch intakte und vitale Zellen aufgenommen.

Zur Kontrolle der Hintergrundfärbung und Kompensation der Doppel- und Dreifachfärbungen wurden entsprechende Isotypantikörperfärbungen eingesetzt.

2.2.3.2 Intrazelluläre Färbungen

Pro Färbung wurden 5×10^5 Zellen verwendet. Nach Waschen der Zellen mit 1ml FACS-Puffer wurden die Zellen mit Paraformaldehydlösung (3,7% PFA in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS, 20 min, RT) fixiert. Danach wurden die Zellen mit Permeabilisierungspuffer (0,33% Saponin in FACS-Puffer) für 10 min permeabilisiert; anschliessend mit dem Primärantikörper in 50 µl Saponinpuffer pro Ansatz 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit Permeabilisierungspuffer wurde nicht-markierter Antikörper durch Färbung mit einem Sekundärantikörper (30 min, RT) detektiert. Im Anschluss wurde ein weiteres Mal mit FACS-puffer gewaschen um restliches Saponin zu entfernen. Zur Messung der Zellen wurde Becton-Dickinson FACS-Scan™ benutzt. Isotypantikörper dienten zur Bestimmung der Hintergrundfärbung.

2.2.3.3 Populationsuntersuchungen

Blutproben von Patienten, die mit Wildtypmasern infiziert waren oder sich mit dem Impfstoff MMR bzw. Masern Lebendimpfstoff (Behring) haben impfen lassen, wurden von Dr. Ralf Nanan (Kinderklinik der Universität Würzburg) abgenommen. Aus diesen Proben wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation (s.2.2.1.3) die PBMC isoliert.

Folgende mAK-Kombinationen wurden zur Färbung und nachfolgender FACS-Scanning-Messung genutzt:

T-Lymphozyten	CD3 ⁺	HLA-DR ⁺	
γδ-T-Zellen	CD3 ⁺	γδ-TCR ⁺	
B-Zellen	CD19 ⁺	HLA-DR ⁺	
Monozyten	CD14 ⁺	HLA-DR ⁺	
Dendritische Zellen	CD3,14,19 ⁻	ILT-3 ⁺	
Myeloide DC	CD3,14,19 ⁻	ILT-3 ⁺	CD11c ⁺
Lymphoide DC	CD3,14,19 ⁻	ILT-3 ⁺	CD11c ⁻
Natürliche Killerzellen	CD3 ⁻	CD16,56 ⁺	

2.2.4 Proliferationstests

2.2.4.1 Mitogen stimulierte Proliferation von T-Zellen

Die Proliferation von T-Zellen kann durch Mitogene, zumeist pflanzliche Lektine z.B. Phytohämagglutinin (PHA) induziert werden. Sie binden unspezifisch an Kohlenhydrat-seitenketten von Membranproteinen der T-Zellen. Diese werden dadurch kreuzvernetzt und vermitteln Signale, die die Zellteilung aktivieren.

In die Näpfe der 96-Loch-Flachbodenplatte wurden 10⁵ PBMC in 100µl RPMI 1640/10% FKS (R10 Medium) gegeben, versetzt mit 100µl Medium mit PHA (2,5µg/ml). Als Kontrolle wurde den Zellen Medium ohne PHA hinzugefügt. Jeder Ansatz erfolgte in 3facher Ausführung. Nach einer Stimulation von 72 Stunden, wobei die Ansätze während der letzten 24 Stunden mit einem Zusatz von 0,5µCi [³H]-Thymidin pro Napf markiert worden waren, erfolgte die Bestimmung des Tritiumeinbaus in die DNS mittels eines Flüssigkeitsszintillationszählers.

Die Auswertung der Ergebnisse wurde als Stimulationsindex (SI) angegeben, der folgendermassen definiert ist:

$$SI = \frac{(^3\text{H-Thymidineinbau})_{\text{stimulierte Zellen}}}{(^3\text{H-Thymidineinbau})_{\text{unstimulierte Zellen}}}$$

2.2.4.2 T-Zell Expansion nach Stimulation mit IL-2+IPP

Die Kombination von IL-2 und dem Phosphoantigen Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) stimuliert die Proliferation von γ/δ -T-Zellen. Zur Untersuchung wurden 5×10^4 PBMC in 100 μ l R10-Medium mit IL-2 versetzt (Endkonzentration im Ansatz 50U/ml) mit bzw. ohne IPP (0,25 μ g/ml). Beide Kombinationen wurden in doppelter Ausführung angesetzt. Die Zellen wurden für 7 Tage kultiviert, anschliessend in FACS-Röhrchen überführt und, wie unter 2.2.3.1 beschrieben, behandelt. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen den γ/δ -T-Zellrezeptor (γ/δ -FITC) und CD3-PE markiert und der Anteil doppelt positiver Zellen im Verhältnis zu einfach CD3 positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die IPP vermittelte Expansion der γ/δ -T-Zellen wurde im Vergleich zu der nur IL-2 enthaltende Probe berechnet und als relative Expansion (RE) bezeichnet.

$$RE = (\text{Zahl der } \gamma/\delta\text{-T-Zellen})_{\text{IL-2+IPP}} / (\text{Zahl der } \gamma/\delta\text{-T-Zellen})_{\text{IL-2}}$$

2.2.5 Stimulation von Monozyten mit LPS und PamCSK

Bei Kontakt mit pathogenen Stoffen ist es die Aufgabe der antigen-präsentierenden Zellen (APC) das Antigen zu erkennen, es zu präsentieren und durch Zytokinausschüttung eine Immunreaktion auszulösen. Bei den APCs sind dies vornehmlich proinflammatorische Zytokine, u.a. Interleukin-1 (IL-1), IL-6 oder TNF- α . Bei in vitro Versuchen kann als Antigen u.a. das als Endotoxin bezeichnete und aus der Zellwand gram-negativer Bakterien gewonnene Lipopolysaccharid (LPS) oder das synthetische Lipopeptid Pam₃CSK₄ verwendet werden. Beide reagieren über sogenannte Toll-like Rezeptoren (TLR) mit APC; LPS mittels TLR 4 Rezeptor und Pam₃CSK₄ über den TLR 2 Rezeptor. Durch die Interaktion mit ihren Liganden induzieren TLR 2 und 4 intrazelluläre Signalkaskaden, die u.a. zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kB und damit von NF-kB-abhängigen Genen führt. Letztlich werden dadurch die Produktion und Ausschüttung der Zytokine induziert.

10^5 PBMC wurden in 200 μ l RPMI 1640/0% FKS (R0 Medium) in Näpfen einer 96-Loch-Tiefbodenplatte 2h kultiviert. In der Zwischenzeit adhärten die Monozyten. Nach mehrmaligem Spülen konnten die relativ reinen Monozytenkulturen mit LPS (*Escherichia coli* serotype 0111:B4; Sigma) (10 ng/ml), bzw. Pam₃CysSerLys₄ (PamCSK) (2.5 μ g/ml) (EMC Microcollections, Tübingen, Germany) in 250 μ l Medium für 18-24 h stimuliert werden. Im Anschluss wurden die Überstände gewonnen und per

ELISA auf IL-6 Sekretion getestet. Die produzierte Menge IL-6 wurde jeweils auf die Anzahl der eingesetzten Monozyten normiert.

2.2.6 Zytokinbestimmung über ELISA

Zur Ermittlung der Konzentrationen an IL-6, IL-1 β , TNF- α wurden kommerzielle Testsysteme verwendet. Für den „enzyme-linked immuno-sorbent assay“ (ELISA) ist die Oberfläche der Näpfe einer 96-Well-Platte mit spezifischen „coating“ Antikörpern bedeckt, die gegen humanes IL-6, IL-1 β oder TNF- α gerichtet sind. An diese Antikörper binden die Zytokine aus den Proben. Nach mehreren Waschschrritten werden die gebundenen Zytokine mittels eines Antikörpers detektiert, an dem ein Enzym gebunden ist, z.B. Meerrettichperoxidase. Nach Streptavidinzugabe entsteht eine Enzymreaktion, die ein farbiges Produkt hervorbringt. Durch Vergleich mit einer Standardreihe kann die Zytokinkonzentration über die Intensität der Farbentwicklung (kolorimetrisch) festgestellt werden.

2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Durch Verwendung einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine in einem Gel nach Anlegen von elektrischer Spannung entsprechend ihrer Grösse aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine vom Gel auf Protein-bindende Membranen können durch Antikörperzugabe spezifische Proteinbanden dargestellt werden.

2.2.7.1 Herstellung von Zelllysaten

Pro Ansatz wurden 10^6 BJABs in 1ml RPMI medium eingesetzt. Nach 48h Inkubation mit 500 μ l der Serumproben bzw einer definierten Menge IFN- α (2U/ml) wurden die Zellen 3 mal mit kaltem PBS gewaschen und zentrifugiert (10min,400xg, 0-4°C). Danach wurde das Pellet mit 200 μ l Lysispuffer (120mM NaCl, 50mM Hepes, 40mM β -Glycerolphosphat, 10mM NaF, 1mM EDTA, 1% NP40, 1mmol Na₃VO₄, sowie 1 Tablette „Protease inhibitor cocktail tablet“ [Roche]) inkubiert (30min,0-4°C) und anschliessend erneut zentrifugiert (15 min, 0-4°C, 30000 U). Der proteinenthaltende Überstand wurde gewonnen und der Proteingehalt kolorimetrisch unter Verwendung des Proteinbestimmungssets von Sigma bestimmt. Die Proteinpräparate wurden bei -20°C eingefroren.

2.2.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die zu analysierenden Proben wurden in einem reduzierenden Probenpuffer aufgenommen und pro Spur gleiche Proteinmengen aufgetragen. Durch die Zugabe von SDS wurden die Proteine denaturiert und mit einer Hülle aus SDS-Molekülen umgeben. Dadurch erhielten die Moleküle eine negative Ladung und konnten in einem elektrischen Feld innerhalb der Gelmatrix entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden.

Trenngel (10%):	1,5M Tris pH 8,7	8ml
	H ₂ O	12,9ml
	Acrylamid/Bisacrylamid	10,6ml
	20% (w/v) SDS	160µl
	TEMED	10µl
	10% Ammoniumpersulfat (APS)	100µl
Sammelgel (4%):	1M Tris pH 6,8	1,25ml
	H ₂ O	6ml
	Acryl/Bisacrylamid	1,3ml
	20% (w/v) SDS	50µl
	TEMED	10µl
	10% APS	100µl,

Der verwendete 10fach konzentrierte Elektrophorese-Puffer enthielt 20mM Tris = 30,3g (pH 8,7), 192mM Glycin (=144,2g) und 3,5% SDS (=10g).

Zum Auftragen der Proben wurde in das noch nicht polymerisierte Sammelgel ein „Kamm“ zur Formung von Taschen eingesetzt, der nach der Polymerisation des Gels und Einfüllen von Elektrophoresepuffer, entfernt wurde.

In der Regel wurden pro Spur ca. 30µg an Protein aufgetragen. Die Proben wurden vor dem Auftrag in die Taschen des Sammelgels mit Probenpuffer (Bromphenolblau 100mg, Glycerin 3,5ml, 2-Mercaptoethanol 2,5ml, SDS 1,5g, 1M Tris-HCl pH6,8 3,2ml) versetzt und für 5 Minuten bei 100°C inkubiert.

Bei Verwendung der Gelapparatur wurde eine Stromstärke von 50mA eingestellt und die Proben über Nacht aufgetrennt. Das Ende der Auftrennung wurde durch das Erreichen des als Laufindikator den Proben zugesetzten Bromphenolblau angezeigt.

2.2.7.3 Western blot – Analyse

Um die, über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennten, Proteine mit einem Antikörper nachzuweisen, mussten die Proteine zunächst aus dem Gel auf eine geeignete Matrix überführt werden. Als Träger eignen sich vor allem Nylon- und Nitrozellulosemembranen. Der Transfer erfolgte auf elektrophoretischem Weg in die proteinbindende Membran. Dabei wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran laufen und dort gebunden werden. Beim Semi-dry Blot wurden Gel und Membran, sandwichartig eingerahmt von Filterpapieren, die bei der Elektrophorese als Ionen-Reservoir dienen, zwischen die Elektroden gelegt.

Das Gel wurde zunächst mit Kathodenpuffer äquilibriert. Auf die Kathodenplatte wurden zwei mit Kathodenpuffer befeuchtete 3MM-Whatmanpapiere gelegt. Das äquilibrierte Gel wurde aufgelegt und mit einer Nylonmembran bedeckt, die mit 30mM Anodenpuffer befeuchtet war. Anschliessend folgten je zwei Lagen 3MM-Whatmanpapiere, die in 30mM bzw 300mM-Anodenpuffer eingelegt waren. Der Transfer der Proteine aus einem Gel erfolgte bei maximaler Spannung und einer Stromstärke von 100mA für eine Stunde.

Nach der Beendigung des Proteintransfers wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nylonmembran mit PBS/Tween/10%Milchpulver für 90 min bei RT oder über Nacht bei 4°C blockiert. Als nächstes erfolgte ein Nachweis der MxA-Proteine auf der Nitrocellulosemembran mittels spezifischer Antikörper (Ak). Die Ak-Verdünnung (1:1000) wurden in PBS/Tween/10%Milchpulver angesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde die Membran dreimal mit 10 min bei RT mit PBS/Tween gewaschen. Der Ak-Nachweis erfolgte über eine Inkubation der Membran mit einem Ziege-anti-Maus-IgG-spezifischen Antikörper (1:5000 in PBS/Tween/10% Milchpulver) gekoppelt an Meerrettichperoxidase. Nach erneuten Waschsritten wurden, mittels des ECL™-Systems von Amersham, die Proteine nachgewiesen. Die Meerrettichperoxidase setzte dabei ein Substrat um, wobei ein Röntgenfilm an der Stelle der spezifisch markierten Proteinbanden über die dabei erfolgende Freisetzung von Photonen geschwärzt wurde.

2.3 Statistische Auswertung

Statistische Analysen wurden mit Hilfe des gepaarten Student t-test durchgeführt; $p < 0,05$ wurde als signifikant festgehalten.

3. Ergebnisse

3.1 Subpopulationen von „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMC) :

Fluktuationen im Verlauf einer Masern-Infektion bzw. nach einer Vakzinierung

3.1.1. Subpopulationen von PBMC

PBMC setzen sich aus distinkten Zelltypen zusammen, deren jeweiliger Anteil an der Gesamtpopulation u.a. infektionsbedingt variiert. Die unterschiedlichen PBMC-Subpopulationen lassen sich aufgrund charakteristischer Marker (Zelloberflächen-Proteine) mittels spezifischer Antikörper identifizieren und unterscheiden. Diese zelltyp-spezifischen Agenzien erlauben im Zusammenwirken mit Analyse-Verfahren, wie der FACS-Technik („fluorescence activated cell sorter“), eine quantitative Erfassung der verschiedenen Zelltypen. Zellen von Kontrollpersonen, Akutpatienten und Impfungen wurden gewonnen wie unter 2.1 und 2.2.1.3 dargestellt. Dabei wurde nach Vitalitätskontrolle der Zellen für jede Subpopulation der prozentuale Anteil an der PBMC-Gesamtpopulation ermittelt.

Folgende Subpopulationen wurden mittels FACS-Analyse untersucht (Charakteristika s. 2.2.3.3):

- Gesamt-T-Lymphozyten (T-Zellen)
- γ/δ T-Zellen ($\gamma\delta$ -Zellen)
- natürliche Killerzellen (NK-Zellen)
- Monozyten (Monozyten)
- natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen)
- B-Lymphozyten (B-Zellen)
- dendritische Zellen (DC)
- myeloide DC (m-DC)
- lymphoide DC (l-DC)

In Fig. 1 ist der Anteil verschiedener Zellpopulationen für eine Kontrollgruppe (n=14) dokumentiert. Die Werte für die einzelnen PBMC-Subpopulationen entsprechen einer Verteilung, wie sie für gesunde Kontrollpersonen typisch ist (Normalverteilung). Die typische PBMC-Gesamtpopulation besteht aus: 64% T-Zellen, 10% NK-Zellen, 15% Monozyten, 10 % B-Zellen und etwa 1% DCs. Die weiteren Zelltypen (NKT-Zellen sowie die myeloiden (m-DC), lymphoiden DC (l-DC) und γ/δ -T-Zellen) werden

üblicherweise nicht in einer Normalverteilung berücksichtigt. Aufgrund ihrer Bedeutung in vorliegender Arbeit sind sie hier zum Vergleich in ihrer prozentualen Verteilung mit genannt.

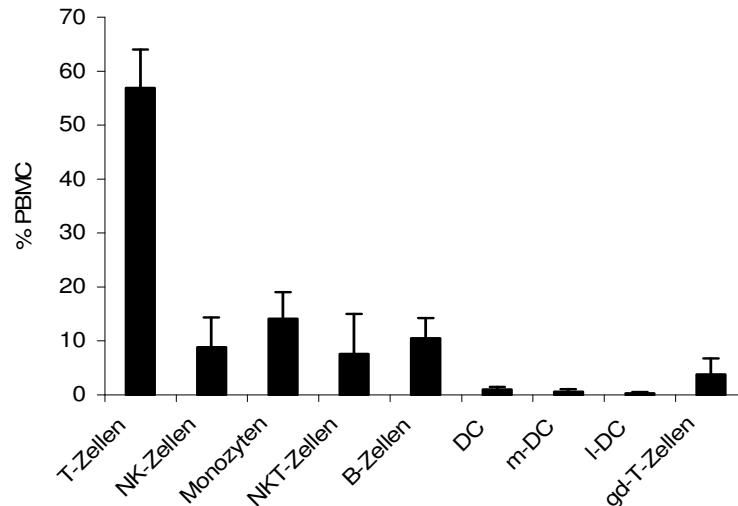


Fig. 1 Anteil der verschiedenen PBMC-Subpopulationen bei Kontrollpersonen

PBMC wurden mit Antikörperkombinationen inkubiert und anschliessend 10^5 Zellen im FACS analysiert. Dargestellt wurde der prozentuale Anteil jeder Subpopulationen der PBMC-Gesamtpopulation (NK= natürliche Killerzellen, NKT= natürliche Killer-T-Zellen, DC= dendritische Zellen, m-DC= myeloide dendritische Zellen, l-DC= lymphoide dendritische Zellen, gd-T-Zellen= γ/δ -T-Zellen)

Die Untersuchung der PBMC-Population ergab durchschnittlich ca. 57% T-Zellen, 8,8% NK-Zellen, 14% Monozyten, 10,5% B-Zellen und 1% DCs. DCs konnten in 0,63% m-DCs und 0,35% l-DCs aufgeschlüsselt werden. Ausserdem wurden 7,6% NKT-Zellen, 3,8% γ/δ -T-Zellen ermittelt.

3.1.2 Zusammensetzung des PBMC Kompartiments im Verlauf einer Masern-Infektion

Im Hinblick auf eine Erfassung möglicher Fluktuationen der verschiedenen PBMC-Subpopulationen nach einer Infektion mit Masern-Viren, wurden verschiedene Krankheitsstadien nach dem Exanthemauftritt verglichen. Dazu wurden Blutproben von Patienten in den verschiedenen Phasen der Erkrankung verglichen. Folgende Krankheitsstadien wurden untersucht:

Kontrolle	gesunde Probanden (Kontrolle, n=14)
Akutphase	1- 6 Tage nach Auftreten des Exanthems (d1-5, n=19)
Zwischenphase	1-3 Wochen nach Exanthem (d6-21, n=7)
Spätphase	> 3 Wochen nach Exanthem (d>21, n=5)

Die Ergebnisse sind in Fig. 2A-C dargestellt

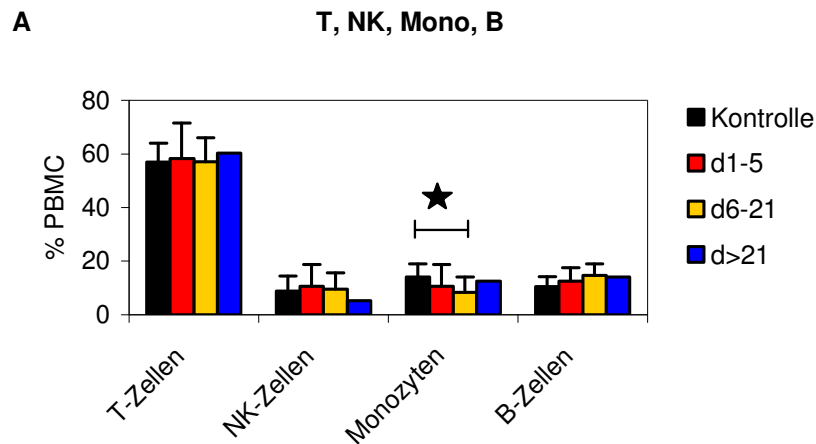


Fig. 2A Anteil von T-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten und B-Zellen an Gesamt-PBMC-population bei Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung

Aus Vollblutproben wurden PBMC von gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) und Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung (d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, d>21= mehr als 21 Tage nach Exanthemauftritt) gewonnen und mit 3fach-Kombinationen von Antikörpern inkubiert. Per FACS-analyse konnte der prozentuale Anteil der Gesamt-PBMC-population ermittelt werden.

Es zeigte sich, daß der Anteil verschiedener Zelltypen an der PBMC-Gesamtpopulation bei den Patienten im Verlauf der Krankheit generell keine großen Veränderungen aufwies, auch zwischen Kontrollgruppe und Patienten waren keine großen Unterschiede nachzuweisen. Signifikante Änderungen ergaben sich lediglich bei den Monozyten sowie den dendritischen Zellen. Die Monozyten zeigten mittelfristig nach Exantheminduktion (d6-21) einen vorübergehenden Abfall, von 14,1%±4,9 bei Kontrolle auf 8,4%±5,6 im Zeitraum d6-21, $p < 0,03$ (Fig. 2A).

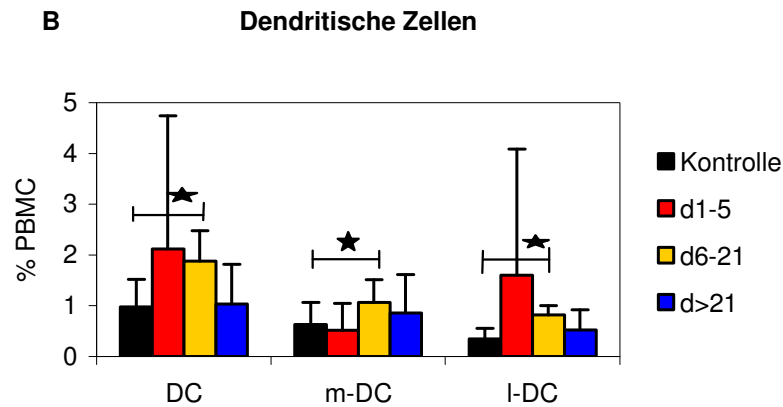


Fig. 2B Anteil dendritischer Zellen (DC) an der Gesamt-PBMC-population bei Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung

Aus Vollblutproben wurden PBMC von gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) und Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung (d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, d>21= mehr als 21 Tage nach Exanthemauftritt) gewonnen und mit 3fach-Kombinationen von Antikörpern inkubiert. Per FACS-analyse konnte der prozentuale Anteil der Gesamt-PBMC-population ermittelt werden. DC wurden in Subpopulationen der myeloiden (m-DC) und lymphoiden DC (l-DC) differenziert. Signifikanzen (*) wurden statistisch mit $p < 0,05$ ermittelt.

Für die dendritischen Zellen (DC, m-DC, l-DC) konnte sowohl früh als auch mittelfristig nach Exantheminduktion ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden von $0,89\% \pm 0,5$ in der Kontrolle auf $1,88\% \pm 0,6$ im Zeitraum d6-21 ($p < 0,01$, DC, Fig. 2B). Aufgeschlüsselt in die Subpopulationen (m- und l-DC) wird zunächst ein Anstieg bei den l-DCs verzeichnet von $0,34\% \pm 0,2$ bei Kontrolle auf $0,82\% \pm 0,18$ im Zeitraum d6-21 ($p < 0,001$, Fig. 2B). Im weiteren Verlauf mehr bei den m-DC von $0,63\% \pm 0,4$ auf $1,06\% \pm 0,4$ im Zeitraum d6-21 (Fig. 2B). Nach 3 Wochen war wieder die Normalverteilung der Zellen erreicht.

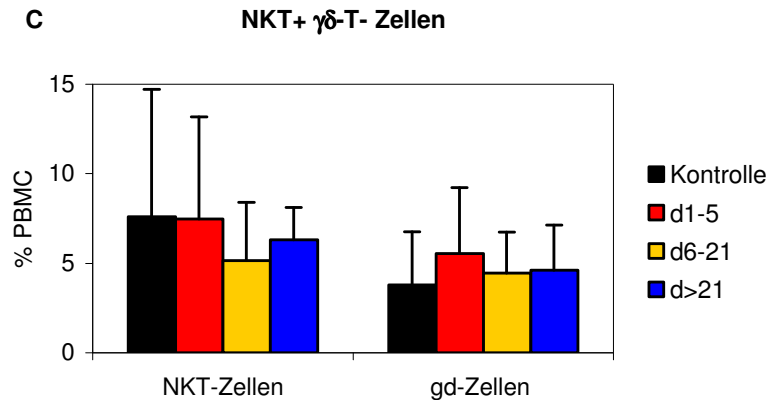


Fig. 2C Anteil natürlicher Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) und γ/δ -T-Zellen (gd-Zellen) an Gesamt-PBMC-population bei Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung

Aus Vollblutproben wurden PBMC von gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) und Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung (d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, d>21= mehr als 21 Tage nach Exanthemauftritt) gewonnen und mit 3fach-Kombinationen von Antikörpern inkubiert. Per FACS-analyse konnte der prozentuale Anteil der Gesamt-PBMC-population ermittelt werden

NKT- und γ/δ -T-Zellen zeigten während des gesamten Untersuchungszeitraums keine signifikanten Veränderungen (Fig. 2C)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich das PBMC Kompartiment im Verlauf des Beobachtungszeitraums als stabil erwies und nur transient die Zahl der Monozyten abfiel, während die der DCs anstieg.

3.1.3 Anteil der PBMC-Populationen nach einer Masern-Impfung

Im Hinblick auf eine Erfassung möglicher Veränderungen der Populationsstärke verschiedener PBMC-Zelltypen nach einer Masern-Vakzinierung wurden den Probanden sowohl vor der Impfung als auch in definierten Zeitintervallen nach der Impfung Blutproben entnommen. Teilweise konnten so serielle Proben gewonnen werden. Ausserdem wurden Einzelproben in die Studie integriert. Folgende Stadien wurden untersucht:

Kontrolle		(Kontrolle, n=14)
d1-5	Tag 1-5 nach Impfung	(d1-5, n=3)
d6-21	1-3 Wochen nach Impfung	(d6-21, n=4)
d>21	mehr als 3 Wochen nach Impfung	(d>21, n=6)

Die Auftrennung der Blutzellen in Subpopulationen und die FACS-Analyse erfolgte wie unter 3.1.1 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Fig. 3A-C dokumentiert.

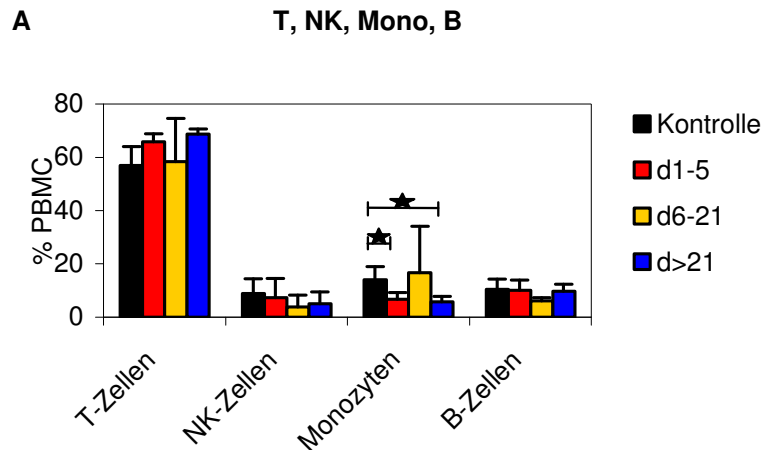


Fig. 3A Frequenz der T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, B-Zellen an der Gesamt-PBMC-population vor und im Verlauf nach Masern-Vakzinierung

Aus Vollblutproben wurden PBMC vor und in den verschiedenen Stadien nach der Impfung (Kontrolle= vor Impfung, d1-5= Tag 1-5 nach Impfung, d6-21= Tag 6-21 nach Impfung, d>21= mehr als 21 Tage nach Impfung) gewonnen und mit 3fach-Kombinationen von Antikörpern inkubiert. Per FACS-analyse konnte der prozentuale Anteil der Gesamt-PBMC-population ermittelt werden. Signifikanzen (*) wurden statistisch mit $p < 0,05$ ermittelt.

Es zeigten sich bei den Probanden über eine Periode von mehr als 3 Wochen *post injectionem* nur wenige signifikante Unterschiede. So war nur die Monozytenpopulation im akuten Stadium und 3 Wochen nach Vakzinierung reduziert von $14,1 \pm 4,9$ bei Kontrolle auf $6,6 \pm 2,6$ bei d1-5, $p < 0,03$ und $5,7 \pm 2,1$ nach d>21 ($p < 0,02$, Fig. 3A). Für den Zeitraum d6-21 sind größere Probenzahlen erforderlich um einen putativen Trend der Monozytenentwicklung nach Impfung zu verifizieren. Interessanterweise zeigte die Monozytenpopulation auch bei Masernpatienten eine vergleichbare Tendenz zur Verringerung der Zellpopulation (siehe Fig. 2A).

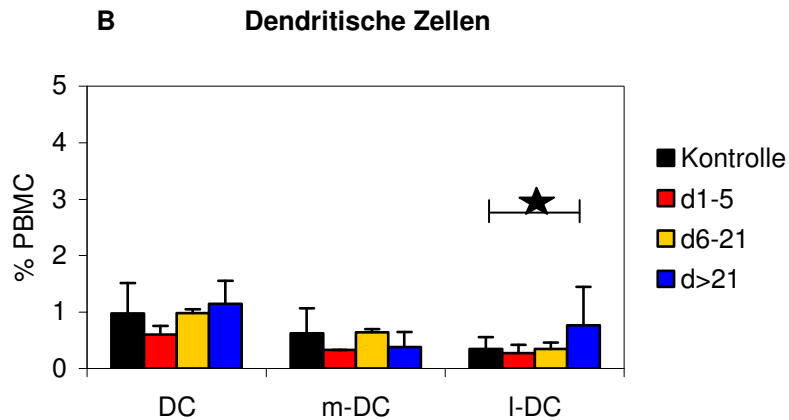


Fig. 3B Frequenz dendritischer Zellen (DC) an der Gesamt-PBMC-Population nach Masern-Vakzinierung

Aus Vollblutproben wurden PBMC vor und in den verschiedenen Stadien nach der Impfung (Kontrolle= vor Impfung, d1-5= Tag 1-5 nach Impfung, d6-21= Tag 6-21 nach Impfung, d>21= mehr als 21 Tage nach Impfung) gewonnen und mit 3fach-Kombinationen von Antikörpern inkubiert. Per FACS-analyse konnte der prozentuale Anteil der Gesamt-PBMC-population ermittelt werden. DC wurden in Subpopulationen der myeloiden (m-DC) und lymphoiden DC (l-DC) differenziert. Signifikanzen (*) wurden statistisch mit $p < 0,05$ ermittelt.

Nach Vakzinierung zeigte die Population der l-DC eine signifikante Veränderung; einen Anstieg des prozentualen Anteils von $0,34 \pm 0,21$ bei Kontrolle auf $0,76 \pm 0,67$ nach 3 Wochen, $p < 0,05$ (Fig. 3B, l-DC, d>21). Es waren ebenfalls die lymphoiden DCs, für die bei Masernpatienten tendenziell, wenn auch transient, einen prozentualen Anstieg ermittelt wurde (Fig. 2B).

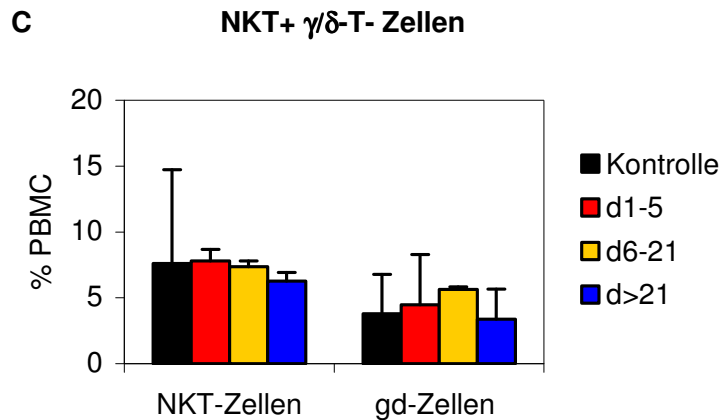


Fig. 3C Frequenz natürlicher Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) und γ/δ -T-Zellen (gd-Zellen) der Gesamt-PBMC-Population

Aus Vollblutproben wurden PBMC vor und in den verschiedenen Stadien nach der Impfung (Kontrolle= vor Impfung, d1-5= Tag 1-5 nach Impfung, d6-21= Tag 6-21 nach Impfung, d>21= mehr als 21 Tage nach Impfung) gewonnen und mit 3fach-Kombinationen von Antikörpern inkubiert. Per FACS-Analyse konnte der prozentuale Anteil der Gesamt-PBMC-population ermittelt werden

Ebenfalls vergleichbar zu den Beobachtungen bei Masernpatienten (Fig. 2C) zeigte sich auch nach Vakzinierung keine signifikante Veränderung des prozentualen Anteils der NKT- bzw γ/δ -T-Zellen (Fig. 3C).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein Trend zur Veränderung nach Vakzinierung die gleichen Zellpopulationen betrifft wie im Verlauf einer Masernerkrankung und daß die Veränderungen in der Tendenz einen vergleichbaren Verlauf zeigen. Eine Erweiterung der Studie mit einer größeren Zahl an Probanden und Proben ist für eine Verifizierung der Aussagen essentiell.

3.2 Werden im Verlauf der Erkrankung oder nach einer Vakzinierung Adhäsionsmoleküle auf T-Zellen moduliert?

T-Zellen machen etwa zwei Drittel der PBMC aus. Auf der Basis unterschiedlicher TCRs lassen sie sich in zwei Subpopulationen, die α/β -T-Zellen und die γ/δ -T-Zellen kategorisieren. γ/δ -T-Zellen scheinen zur „ersten Abwehrlinie“ gegen eindringende Pathogene zu gehören, während die α/β -T-Zellen die adaptive Immunreaktion ausmachen. Die Zell-Zell-Kontakte von APC und T-Zellen werden durch spezifische Adhäsionsmoleküle vermittelt. Zwei dieser Moleküle sind CD11a (LFA-1) und CD54

(ICAM 1). Je nach Aktivierungsgrad kann man LFA-1 bzw ICAM 1 „hoch“ (high) oder „niedrig“ (low) exprimierende Zellen unterscheiden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die CD11a^{high+} bzw CD54^{high+} Populationen der α/β -T-Zellen bzw. γ/δ -T-Zellen untersucht. Dazu wurden jeweils etwa 10^5 PBMC per FACS analysiert und der Prozentanteil beider Zellpopulationen ermittelt.

3.2.1 Akutpatienten

Es wurden Proben von Masernpatienten in verschiedenen Stadien nach der Virusexposition (akute Phase; Zwischenphase; Spätphase; siehe 3.1.2) untersucht. Der Anteil von CD11a^{high+}/ CD54^{high+} Zellen an der Gesamtpopulation wurde sowohl für die α/β -T-Zellen (Fig. 4A) als auch für die γ/δ -T-Zellen (Fig. 4B) bestimmt.

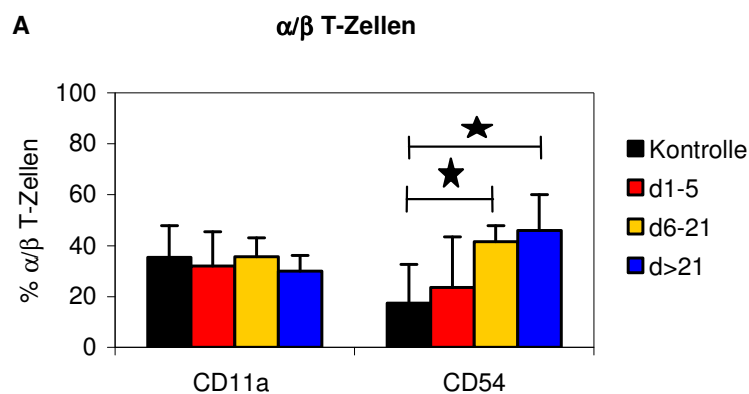


Fig. 4A Anteil der CD11a^{high+} bzw CD54^{high+} Populationen von α/β -T-Zellen im Verlauf der Akuterkrankung

Durch Dreifachfärbung von PBMCs auf CD3⁺, γ/δ -TCR⁻ sowie CD11a bzw CD54 konnte in der FACS-analyse der Anteil CD11a^{high+} bzw CD54^{high+} Populationen bei α/β -T-Zellen gesunder Kontrollpersonen (Kontrolle) und Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung (d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, d>21= mehr als 21 Tage nach Exanthemauftritt) ermittelt und die Werte prozentual dargestellt werden. Signifikanzen (*) wurden statistisch mit $p < 0,05$ ermittelt.

Bei den α/β -T-Zellen zeigte sich, dass im Verlauf der Erkrankung der Anteil CD11a^{high+} exprimierenden Zellen unverändert blieb (Fig. 4A). Auch CD54^{high+} α/β -T-Zellen zeigten in der akuten Phase noch keine signifikante Veränderung. Im Verlauf der Erkrankung war jedoch eine deutliche Zunahme des prozentualen Anteils dieser Zellpopulationen zu beobachten, von $17,3\% \pm 17,5$ bei Kontrolle auf $41,6\% \pm 6,3$ (d6-21), $p < 0,02$ und $45,8\% \pm 14,1$ (d>21) (Fig. 4A).

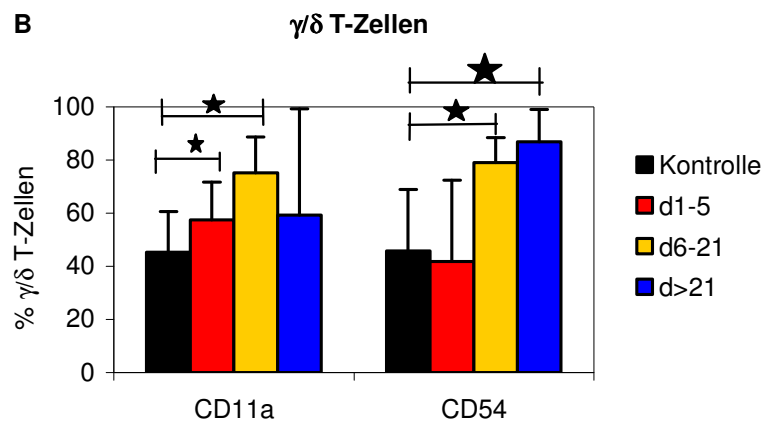


Fig. 4B Anteil der CD11a^{high+} bzw CD54^{high+} Populationen von γ/δ -T-Zellen im Verlauf der Akuterkrankung

Durch Dreifachfärbung von PBMCs auf CD3⁺, γ/δ -TCR⁺ sowie CD11a bzw CD54 konnte in der FACS-analyse der Anteil CD11a^{high+} bzw CD54^{high+} Populationen bei γ/δ -T-Zellen gesunder Kontrollpersonen (Kontrolle) und Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung (d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, d>21= mehr als 21 Tage nach Exanthemauftritt) ermittelt und die Werte prozentual dargestellt werden. Signifikanzen (*) wurden statistisch mit p<0,05 ermittelt.

Bei den γ/δ -T-Zellen ergab sich im Verlauf der Erkrankung für die CD11a^{high+} Subpopulation eine mässige, transiente Erhöhung von 45,7%±23,1 auf 78,9%±9,6 (d6-21) und 86,8%±12,1 (d>21), p<0,02, Fig. 4B), während bei der CD54^{high+} Subpopulation eine sehr deutliche Erhöhung ermittelt wurde (45,8%±23,1 bei Kontrolle auf 78,9%±9,6, (d6-21), p<0,02 und 86,8%±12,1 (d>21), p<0,04, Fig. 4B).

Zusammenfassend zeigte sich bei Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung, dass die erste Abwehrreaktion, über γ/δ -T-Zellen vermittelt, als eine signifikante Erhöhung der CD11a^{high+} und CD54^{high+} Expression an der Zelloberfläche der T-Zellen nachweisbar ist, während sich die adaptive Immunreaktion, über α/β -T-Zellen vermittelt, nur in einer Veränderung des CD54^{high+} Markers, nicht aber CD11a^{high+} zeigt.

3.2.2 Probanden nach Impfung

Im Folgenden wurden vergleichbare Analysen an geimpften Probanden durchgeführt. Dazu wurden den geimpften Probanden sowohl vor der Vakzinierung als auch in

definierten Zeitintervallen nach der Vakzinierung Blutproben entnommen. Die Einteilung der Proben in Stadien entspricht der Einteilung von 3.1.3.

Durch Dreifachfärbung von PBMCs auf CD3, γ/δ -TCR sowie CD11a bzw CD54 wurde der Anteil von der CD11a^{high+} bzw CD54^{high+} Subpopulationen sowohl bei den α/β -T-Zellen (Fig. 5A) als auch den γ/δ -T-Zellen (Fig. 5B) vor und in den verschiedenen Stadien nach der Impfung ermittelt und die Werte prozentual dargestellt. Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in Fig. 5A/B dargestellt.

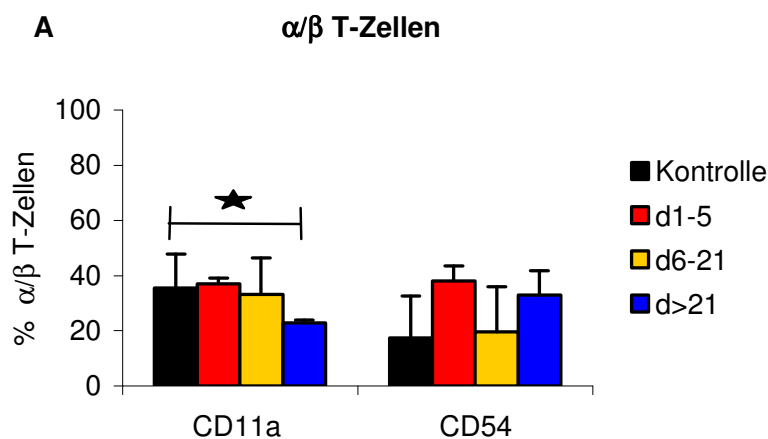


Fig. 5A Anteil der CD11a^{high+} bzw CD54^{high+} Populationen von α/β -T-Zellen nach Masernvakzinierung

Durch Dreifachfärbung von PBMCs auf CD3, γ/δ -TCR sowie CD11a bzw CD54 konnte in der FACS-analyse der Anteil CD11a^{high+} bzw CD54^{high+} Subpopulationen bei den α/β -T-Zellen vor und in den verschiedenen Stadien nach der Impfung (Kontrolle= vor Impfung, d1-5= Tag 1-5 nach Impfung, d6-21= Tag 6-21 nach Impfung, d>21= mehr als 21 Tage nach Impfung) ermittelt und die Werte prozentual dargestellt werden. Signifikanzen (*) wurden statistisch mit $p < 0,05$ ermittelt.

Anders als bei Masernpatienten zeigte sich nach der Impfung bei den α/β -T-Zellen eine sinkender Anteil an CD11a^{high+} exprimierenden Zellen. Dabei verringerte sich der Anteil von $35,5 \pm 12,1\%$ am Tag 0 nach etwa 3 Wochen auf einen Wert von $22,9 \pm 1,05\%$ ($p < 0,05$, d>21, Fig. 5A).

Für die CD54^{high+} Zellen ergab sich ein komplexeres Bild. Innerhalb der 3 Wochen nach Impfung variierte der Anteil der CD54^{high+} Zellen zwischen $17,5\%$ vor Impfung und $38 \pm 5,5\%$ in der Frühphase nach Exanthem sowie $19,6\%$ (d6-21) und $32,9 \pm 9\%$ nach mehr als 3 Wochen (d>21, Fig. 5A). Die vergleichbare Tendenz der CD54-Expression der α/β -T-Zellen bei Masernpatienten (Fig. 4A) und Impfungen muß in weiterführenden

Studien insbesondere durch umfangreichere Datensätze für die Phase d6-21 verifiziert werden.

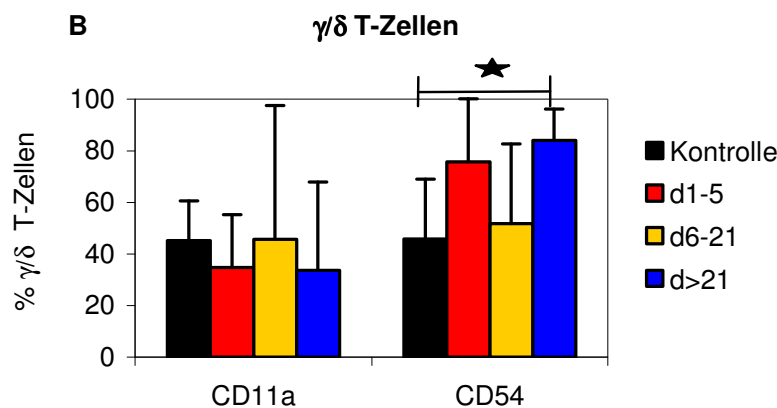


Fig. 5B Anteil der CD11a^{high+} bzw CD54^{high+} Populationen von γ/δ -T-Zellen nach Masernvakzinierung

Durch Dreifachfärbung von PBMCs auf CD3, γ/δ -TCR sowie CD11a bzw CD54 konnte in der FACS-analyse der Anteil CD11a^{high+} bzw CD54^{high+} Subpopulationen bei den γ/δ -T-Zellen vor und in den verschiedenen Stadien nach der Impfung (Kontrolle= vor Impfung, d1-5= Tag 1-5 nach Impfung, d6-21= Tag 6-21 nach Impfung, d>21= mehr als 21 Tage nach Impfung) ermittelt und die Werte prozentual dargestellt werden. Signifikanzen (*) wurden statistisch mit $p < 0,05$ ermittelt.

Für die Subpopulation der γ/δ -T-Zellen ergab sich nach der Impfung ein uneinheitliches Bild mit relativ stark schwankenden Werten (Fig. 5B). So sank der Anteil an CD11a^{high+} Zellen leicht von $45,2 \pm 15,3\%$ auf einen Wert von $35,7\%$ 3 Wochen nach Impfung. Der Anteil an CD54^{high+} Zellen stieg von $45,7 \pm 23,1\%$ auf $75 \pm 24\%$ in der Frühphase und erreichte nach 3 Wochen einen Wert von $84,1 \pm 12,1\%$ ($p=0,02$, Fig. 5B).

Ähnlich wie bei den α/β -T-Zellen (s.o.), müssten die Daten für den Zeitraum d6-21 durch weitere Analysen gestützt werden. Hier könnte eine Trendverschiebung durch eine hohe Streuung von Einzelergebnissen verwischt worden sein.

Zusammenfassend zeigen die Befunde, daß bei geimpften Probanden für die α/β -T-Zellen der Anteil an CD11a^{high+} Zellen abnahm und auf niedrigem Niveau verblieb. Anders als bei Masernpatienten zeigt der CD11a Marker in der Zellpopulation der „ersten Abwehr“ (γ/δ -T-Zellen) keine signifikante Veränderungen. Tendenziell könnte man bezüglich der CD54^{high+} Zellen (unter Berücksichtigung der Ausnahme bei den d6-21 Werten) von einem vergleichbaren Verlauf wie bei Masernpatienten sprechen.

Interpretiert man den Wert im Zeitraum d6-21 als noch nicht hinreichend gefestigt, zeigen sich insgesamt tendenziell Übereinstimmungen mit Masernpatienten.

3.3 Nachweis von Oberflächenmolekülen von aktivierten T-Zellen

Das Oberflächenprotein CD69 wird in Lymphozyten unmittelbar nach einer Aktivierung exprimiert und gilt als ein frühzeitiger Marker für die Reaktion von T-Lymphozyten nach einem Antigenkontakt. Es handelt sich um ein Membranprotein mit einer C-Typ Lectin-Domäne. CD69 wird eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Aktivierung zugeschrieben und daher auch als „activation inducer molecule“ (AIM) bezeichnet.

CD25 ist ein stark glycosyliertes Membranprotein und fungiert als α -Kette des Rezeptors für Interleukin-2.

3.3.1 Akutpatienten

Proben von Masernpatienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Virusexposition (s.3.1.2) wurden hinsichtlich der beiden T-Zell-Subpopulationen α/β -T-Zellen (Fig. 6A) und γ/δ -T-Zellen (Fig. 6B) untersucht. Per FACS-Analyse wurden die beiden T-Zell-Populationen hinsichtlich ihrer CD69- und CD25-Expression analysiert und jeweils der Anteil an CD69⁺ bzw CD25⁺ Zellen ermittelt.

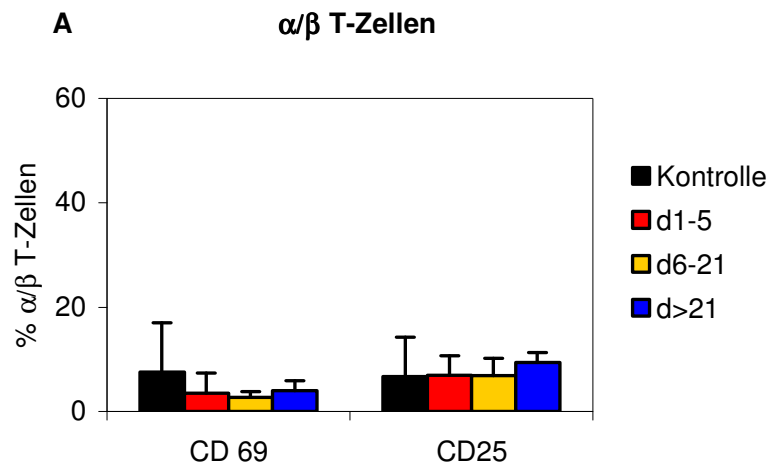


Fig. 6A CD69 bzw. CD25 exprimierende Zellen innerhalb der α/β -T-Zellpopulation bei akuter MV-Infektion.

Aus Vollblutproben wurden PBMC von gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) und Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung (d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, d>21= mehr als 21 Tage nach Exanthemauftritt) gewonnen und mit Antikörpern gegen CD3, γ/δ -TCR und CD69 bzw. CD25 inkubiert. In der anschließenden FACS-analyse wurden 10^5 PBMC gezählt, die $CD3^+$ und γ/δ -TCR $^-$ gekennzeichnet waren. Sie wurden auf ihren relativen Anteil an $CD69^+$ bzw. $CD25^+$ Zellen getestet.

Es zeigte sich, dass die Population der α/β -T-Zellen (Fig. 6A) nur relativ wenige $CD69^+$ Zellen aufwies. Der Anteil nahm im Verlauf der Erkrankung noch weiter ab. Diese Abnahme zeigte jedoch keine Signifikanz (Fig. 6A).

Auch der Anteil der $CD25^+$ Zellen war insgesamt niedrig. Er blieb im Verlauf der Erkrankung relativ konstant (Fig. 6A).

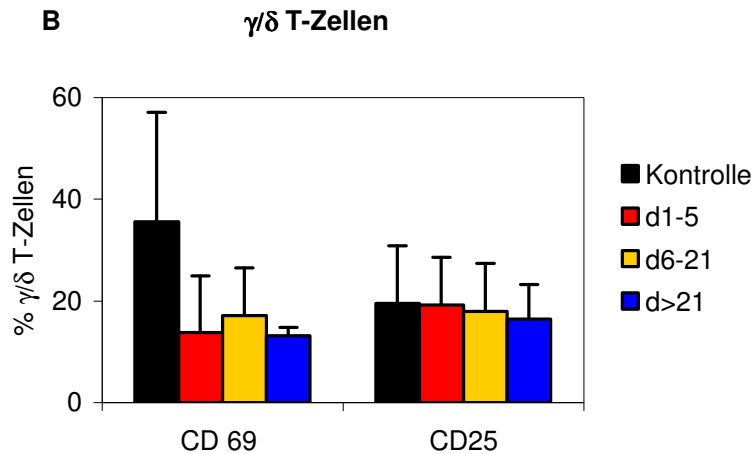


Fig. 6B Anteil der CD69 bzw. CD25 exprimierenden Zellen in der Subpopulation der γ/δ -T-Zellen in den verschiedenen Phasen der Masernerkrankung.

Aus Vollblutproben wurden PBMC von gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) und Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung (d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, d>21= mehr als 21 Tage nach Exanthemauftritt) gewonnen und mit Antikörpern gegen CD3, γ/δ -TCR und CD69 bzw. CD25 inkubiert. In der anschließenden FACS-analyse wurden 10^5 PBMC gezählt, die CD3⁺ und γ/δ -TCR⁺ gekennzeichnet waren. Sie wurden auf ihren relativen Anteil an CD69⁺ bzw. CD 25⁺ Zellen getestet. Signifikanzen (*) wurden statistisch mit $p < 0,05$ ermittelt.

Die Subpopulation der γ/δ -T-Zellen (Fig. 6B) wies insgesamt einen sehr viel höheren Anteil CD69 bzw. CD25 exprimierender Zellen auf als die α/β -T-Zellen. In dieser Subpopulation war nach der Infektion der Anteil an CD69⁺-Zellen um mehr als die Hälfte reduziert; der Wert sank von $35,7 \pm 21,6\%$ (Kontrolle) auf $13,1 \pm 1,9\%$ ca 3 Wochen nach Exanthemauftritt (Fig. 6B, CD69, $p < 0,05$). Dieser reduzierte Anteil der CD69⁺ Zellen blieb während des gesamten Krankheitsverlaufs erhalten. Im Gegensatz dazu gab es keine nennenswerte Veränderung bei den CD25⁺ Zellen; der Anteil blieb nahezu konstant (Fig. 6B).

3.3.2 Impflinge

Im Folgenden wurden dieselben Analysen (s. 3.3.1) an Impfprobanden durchgeführt. Hierzu wurden die Proben zu unterschiedlichen Zeitabschnitten nach der Vakzinierung entnommen und analysiert. Die Befunde für die α/β -T-Zellen sind in Fig. 7A und für γ/δ -T-Zellen in Fig. 7B dokumentiert.

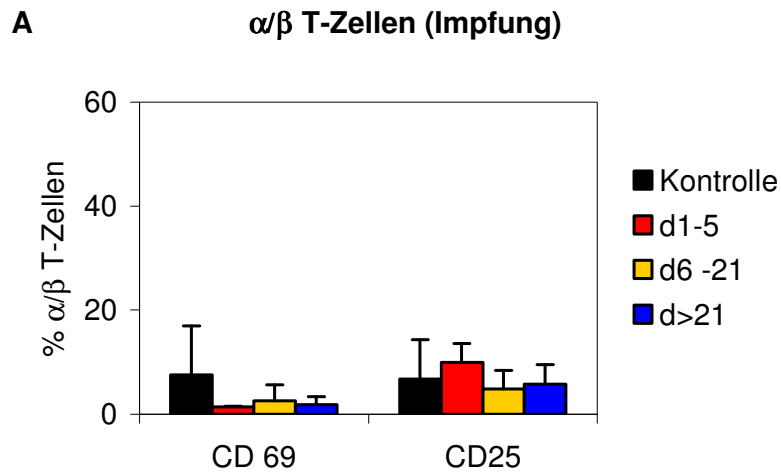


Fig. 7A Anteil der CD69 bzw. CD25 exprimierenden Zellen in der Subpopulation der α/β -T-Zellen in den verschiedenen Phasen nach einer Masernvakzinierung.

Aus Vollblutproben wurden PBMC von Impflingen vor und im Verlauf nach Impfung (Kontrolle= vor Impfung, d1-5= Tag 1-5 nach Impfung, d6-21= Tag 6-21 nach Impfung, d>21= mehr als 21 Tage nach Impfung) gewonnen und mit Antikörpern gegen CD3, γ/δ -TCR und CD69 bzw CD25 inkubiert. In der anschließenden FACS-analyse wurden 10^5 PBMC gezählt, die CD3⁺ und γ/δ -TCR⁺ gekennzeichnet waren. Sie wurden auf ihren relativen Anteil an CD69⁺ bzw CD 25⁺ Zellen getestet.

Der Anteil CD69 exprimierender α/β -T-Zellen (Fig. 7A) war im gesamten Beobachtungszeitraum, ähnlich wie in MV-infizierten Patienten, sehr gering. Wie schon bei Masernpatienten beobachtet, zeigt sich auch hier eine Tendenz zur Abnahme der CD69 Werte. So sank der Anteil an CD69⁺ Zellen von $7,5 \pm 9,3\%$ (Kontrolle) auf $2,2 \pm 2,8\%$ (d>21) ab (Fig. 7A). Der Anteil an CD25⁺ Zellen stieg in der Frühphase nach Impfung leicht an und ging danach auf das ursprüngliche Niveau zurück. Alle genannten Veränderungen sind nicht signifikant.

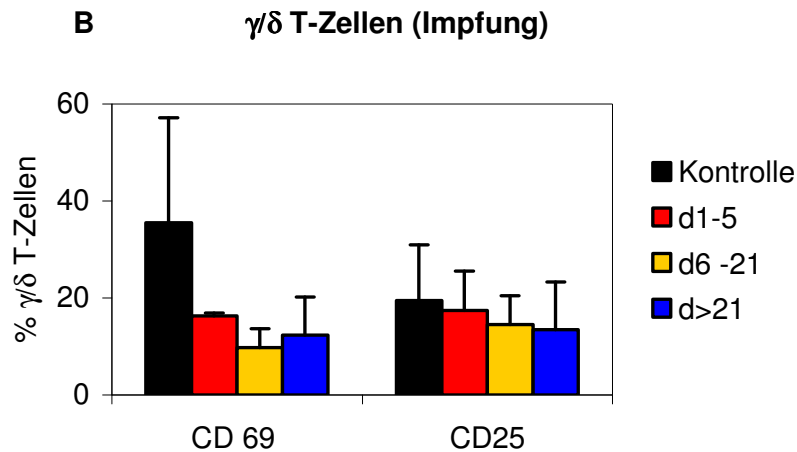


Fig. 7B Anteil der CD69 bzw. CD25 exprimierenden Zellen in der Subpopulation der γ/δ -T-Zellen in den verschiedenen Phasen nach einer Masernvakzinierung.

Aus Vollblutproben wurden PBMC von Impfungen vor und im Verlauf nach Impfung (Kontrolle= vor Impfung, d1-5= Tag 1-5 nach Impfung, d6-21= Tag 6-21 nach Impfung, d>21= mehr als 21 Tage nach Impfung) gewonnen und mit Antikörpern gegen CD3, γ/δ -TCR und CD69 bzw CD25 inkubiert. In der anschließenden FACS-analyse wurden 10^5 PBMC gezählt, die $CD3^+$ und γ/δ -TCR $^+$ gekennzeichnet waren. Sie wurden auf ihren relativen Anteil an $CD69^+$ bzw $CD 25^+$ Zellen getestet. Signifikanzen (*) wurden statistisch mit $p<0,05$ ermittelt.

Die in Fig. 7B dargestellten Daten für γ/δ -T-Zellen zeigen, daß der Anteil an $CD69^+$ Zellen unmittelbar nach der Impfung stark abnahm; der Wert sank von $35,1\pm 21,6\%$ (Kontrolle) auf $9,7\pm 3,8\%$ in der Intermediärphase (d6-21), $p<0,04$) und $15\pm 12,1\%$ etwa 3 Wochen nach der Impfung (d>21). Bei den $CD25$ exprimierenden Zellen zeigte sich tendenziell eine leichte Reduktion, die sich als nicht signifikant erwies. Der Anteil an $CD25^+$ Zellen nahm von $19,5\pm 11,4\%$ (Fig. 7B, Kontrolle) auf $14,5\pm 5,5\%$ (d6-21) ab und blieb über den beobachteten Zeitraum auf dem niedrigen Niveau.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der relative Anteil an $CD69^+$ bzw $CD25^+$ Zellen bei γ/δ -T-Zellen höher als bei den α/β -T-Zellen. Sowohl nach Infektion als auch nach einer Vakzinierung war eine deutliche Reduzierung des Anteils an $CD69^+$ Zellen zu beobachten. Der Anteil an $CD25^+$ Zellen blieb dagegen relativ konstant sowohl bei den α/β -T-Zellen als auch den γ/δ -T-Zellen.

3.4 Typ1-Interferon (Typ1-IFN) Sekretion bei Masernpatienten und nach Impfung

Bei der Abwehr von Virusinfektionen sind Interferone, speziell Typ1-Interferone (IFN α und IFN β) von zentraler Bedeutung. Sie werden von virus-infizierten Zellen freigesetzt, wodurch benachbarte Zellen einen virus-resistenten Status generieren können. Außerdem unterstützen Typ1-Interferone die spätere Aktivierung des spezifischen Immunsystems gegen virus-infizierte Zellen.

Die Seren von Masernpatienten verschiedener Stadien nach Ausbruch der Krankheit wurden verglichen:

- Inkubationsphase Tage nach Infektion; aber vor Exanthemauftritt (Masern, n=6)
- Akutphase 1-5 Tage nach Auftreten des Exanthems (Masern, n=20)
- Zwischenphase 6-21 Tage nach Exanthem (Masern, n=7)
- Spätphase mehr als 21 Tage nach Exanthem (Masern, n=8)

Die Seren der Impflinge wurden in folgende Stadien eingeteilt:

- vor Impfung (Impfung, n=6)
- 7-12 Tage nach Impfung (Impfung, n=6)

Zusätzlich wurden Seren von einigen Mumpspatienten analysiert:

- 1- 5 Tage nach Exanthemauftritt (Mumps, n=2)
- 6-21 Tage nach Exanthemauftritt (Mumps, n=3)

Eine Abschätzung der Interferon-Konzentrationen im Serum ist mit Hilfe eines indirekten Testverfahrens möglich. Dabei wurden 10^6 BJAB-Zellen mit 500 μ l Patientenserum für 48h inkubiert. In diesen Zellen wird dosisabhängig durch Typ1-IFN die intrazelluläre Synthese des MxA-Proteins induziert. Das Protein wurde im Western-blot identifiziert und mit Hilfe von Vergleichsproben (BJAB-Zellen mit 2U/ml IFN- α inkubiert) quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Fig. 8 dargestellt.

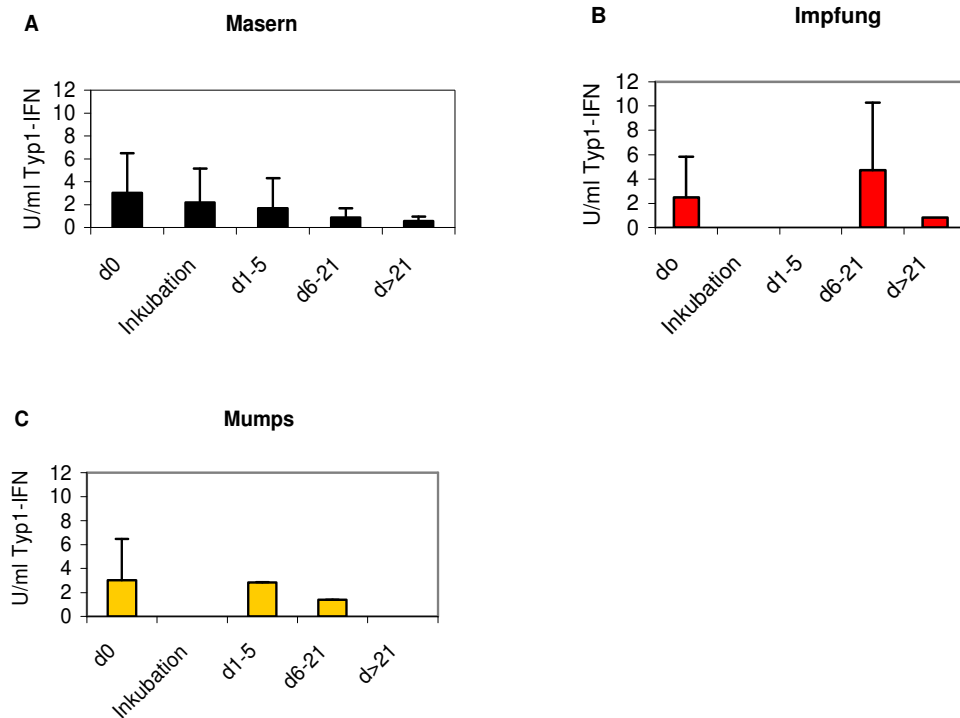


Fig. 8A-C Konzentration an Typ1-IFN bei Masern-Infektion bzw. nach einer Masern-Vakzinierung sowie bei Mumps-Patienten

Serum wurde von Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung (d0= Kontrollgruppe, Inkubation= Zeitraum nach Infektion aber vor Exanthemauftritt, d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, d>21= mehr als 21 Tage nach Exanthemauftritt, Fig. 8A), von Impfungen vor und im Verlauf nach Impfung (d0= vor Impfung, d6-21= Tag 6-21 nach Impfung, d>21= mehr als 21 Tage nach Impfung, Fig. 8B) sowie von Mumpspatienten im Verlauf nach Exanthemabildung (d0= Kontrollegruppe, d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, Fig. 8C) gewonnen. 10^6 BJAB-Zellen wurden mit 500 μ l Patientenserum über 48 Stunden inkubiert. Im Serum enthaltenes Typ1-IFN induziert die intrazelluläre Produktion von MxA-Protein in BJAB-Zellen. Definierte Proben konnten im Western-blot einen quantitativen Vergleich der zu analysierenden Proben bieten.

Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (d0) wurde bei Masernpatienten (Fig. 8A) eine kontinuierliche Abnahme der Typ1-IFN-Konzentration nachgewiesen. Sie sank bis auf 0,55 U/ml in der Spätphase (d>21, Fig. 8A).

Bei den geimpften Patienten (Fig. 8B) variierten die ermittelten Titer sehr stark; im Stadium d6-21 nach Impfung wurde im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Typ1-IFN-Konzentration nachgewiesen. Nach mehr als 3 Wochen nach Exanthemauftritt war die Typ1-IFN deutlich erniedrigt (Impfung, d>21, Fig. 8B).

Bei den Mumpspatienten war im zeitlichen Verlauf ein allmählicher Abfall der Typ1-IFN-Konzentration nachweisbar (Mumps, d6-21, Fig. 8C).

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse bei Masernpatienten eine kontinuierliche Abnahme der Typ1-IFN Konzentration. Auch bei Impfungen und Mumpspatienten konnte tendenziell eine Reduktion der Typ1-IFN-Konzentration festgestellt werden. Bei den Ergebnissen ist eine insgesamt geringe Probenzahl zu berücksichtigen, ebenso die relativ großen interindividuellen Unterschiede bezüglich der gemessenen Typ1-IFN-Konzentration.

3.5 Proliferationsfähigkeit von T-Zellen nach Masernvirusinfektion bzw. nach Masern-Vakzinierung

Nach der Aktivierung durch ihr Antigen beginnen die T-Zellen zu proliferieren. Eine reduzierte Proliferationsrate der T-Zellen ist wahrscheinlich zentral für eine Immunsuppression, wie sie bei der Masern-Erkrankung beobachtet wird. Daher wurde im Folgenden die Proliferationskapazität der T-Zellen untersucht.

3.5.1. Proliferationsfähigkeit der $\alpha\beta$ -T-Zellen

Durch das Mitogen PHA (Phytohämagglutinin) wird die Proliferation von $\alpha\beta$ -T-Zellen stimuliert. Im Experiment wurden die PBMC von Masernpatienten bzw. von geimpften Probanden nach einer 48stündigen PHA-Exposition für weitere 24 Stunden mit H^3 -Thymidin inkubiert. Die von den Zellen inkorporierte Radioaktivität wurde anschliessend im Harvester quantitativ bestimmt. Die Auswertung der Ergebnisse wurde als Stimulationsindex (SI) angegeben, der folgendermassen definiert ist:

$$SI = ({}^3H\text{-Thymidineinbau})_{\text{stimulierte Zellen}} / ({}^3H\text{-Thymidineinbau})_{\text{unstimulierte Zellen}}$$

Nachfolgend (Fig 9A/B) sind die Ergebnisse der Zellen von Masernpatienten verschiedener Stadien nach Virusexposition (siehe 3.1.2) bzw von Impfungen vor und nach Impfung (siehe 3.1.3) dargestellt.

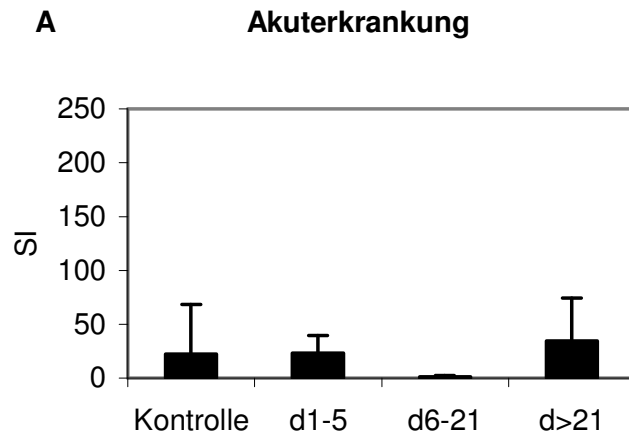


Fig. 9A Proliferationsfähigkeit von T-Zellen nach Masernvirusinfektion

Die PBMC von gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) und Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung (d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, d>21= mehr als 21 Tage nach Exanthemauftritt) wurden nach einer 48 stündigen PHA-Exposition für weitere 24 Stunden mit H^3 -Thymidin inkubiert. Anschließend wurde die von den Zellen inkorporierte Radioaktivität quantitativ bestimmt. Die ermittelten Werte wurden als Stimulationsindex (SI) dargestellt.

Für die Proben der erkrankten Patienten zeigte sich, daß es im Verlauf zu einer deutlichen Reduktion der Proliferation kommt (in der Intermediärphase $SI= 1,32\pm 1,2$, d6-21, Fig. 9A) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($SI= 22,3\pm 46$, Fig. 9A).

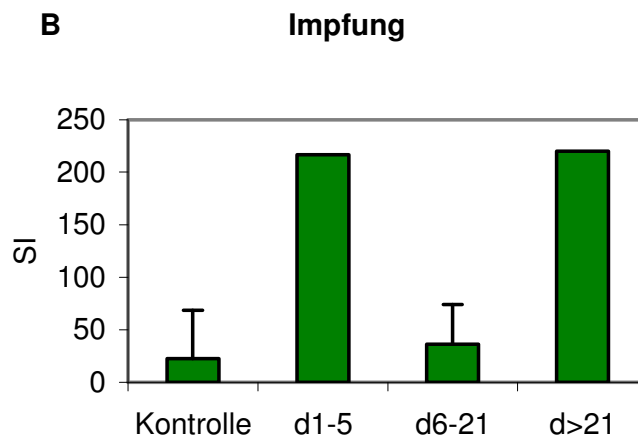


Fig. 9B Proliferationsfähigkeit von T-Zellen nach Masern-Vakzinierung.

Die PBMC von Impfungen vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Impfung (Kontrolle= vor Impfung, d1-5= Tag 1-5 nach Impfung, d6-21= Tag 6-21 nach Impfung, d>21= mehr als 21 Tage nach Impfung) wurden nach einer 48 stündigen PHA-Exposition für weitere 24 Stunden mit H^3 -Thymidin inkubiert. Anschließend wurde die von den Zellen inkorporierte Radioaktivität quantitativ bestimmt. Die ermittelten Werte wurden als Stimulationsindex (SI) dargestellt.

Interessanterweise wiesen die Stimulationsindices der Impflinge in eine ganz andere Richtung. In der Kontrollgruppe ergaben sich Werte von $SI = 22,3 \pm 46$. In der Früh- bzw Spätphase nach Impfung wurde ein sehr hoher Stimulationsindex (SI) ($SI = 216$ für d1-5, bzw $SI = 219$ für d>21) gemessen. Für die Intermediärphase wurde ein Stimulationsindex von $SI = 36,1 \pm 37$ bestimmt. Sieht man von den abweichenden Werten d6-21 ab, zeigt sich eine deutliche Simulation der Proliferationsrate.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, daß es im Verlauf der Erkrankung vorübergehend zu einer signifikant verminderten Proliferationsfähigkeit kommt. Bei den Impflingen jedoch war eine deutlich gesteigerte Proliferationsfähigkeit nachweisbar.

3.5.2. Proliferationsfähigkeit von $\gamma\delta$ -T-Zellen

Bei $\gamma\delta$ -T-Zellen wird durch PHA keine Proliferation ausgelöst. Sie müssen daher in einer für sie spezifischen Weise stimuliert werden. Hierfür wurden PBMC für 7 Tage entweder mit IL-2 oder IL-2 / IPP inkubiert und anschliessend die Zahl der expandierten $\gamma\delta$ -T-Zellen ermittelt. Dies geschieht mittels einer Doppelfärbung durch die der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen an der Gesamt-T-Zellpopulation anhand einer FACS-Analyse bestimmt wird. Die Ergebnisse wurden als „relative Expansion“ (RE) im Vergleich zur IL-2-stimulierten Kontrolle dargestellt und in Fig.10 dokumentiert.

$$RE = (\text{Zahl der } \gamma\delta\text{-T-Zellen})_{IL-2+IPP} / (\text{Zahl der } \gamma\delta\text{-T-Zellen})_{IL-2}$$

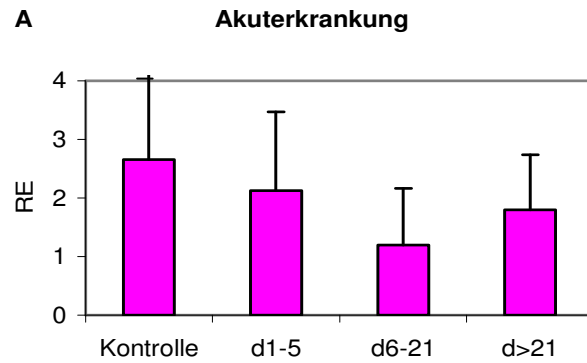


Fig. 10A Proliferationsfähigkeit der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Verlauf der Erkrankung

PBMC von gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) und Masernpatienten im Verlauf der Erkrankung (d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, d>21= mehr als 21 Tage nach Exanthemauftritt) wurden mit IL2 bzw IL2 und IPP inkubiert und per FACS-analyse der $\gamma\delta$ -T-Zellanteil ermittelt. Die Darstellung als relative Expansion (RE) ergibt sich aus dem direkten Vergleich von Proben die nur mit IL-2 stimuliert wurden und Proben, die mit IL-2+IPP inkubiert sind.

Proben von Masernpatienten verschiedener Stadien nach Auftreten des Exanthems (wie in 3.1.2 beschrieben) wurden untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem RE-Wert von 2,5 (Kontrolle, Fig.10A) sank die Proliferationsfähigkeit der $\gamma\delta$ -T-Zellen der Patienten auf RE= 1,2 (d6-21, Fig.10A). In der Spätphase war wieder eine leicht erhöhte Proliferationsfähigkeit zu beobachten (RE= 1,8 d>21, Fig.10A).

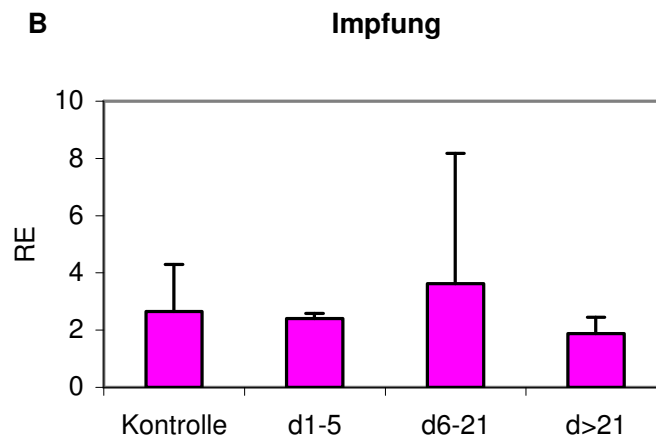


Fig. 10B Proliferationsfähigkeit der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Verlauf der Impfung

PBMC von Impflingen vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Impfung (Kontrolle= vor Impfung, d1-5= Tag 1-5 nach Impfung, d6-21= Tag 6-21 nach Impfung, d>21= mehr als 21 Tage nach Impfung) wurden mit IL-2 bzw IL-2 und IPP inkubiert und per FACS-analyse der $\gamma\delta$ -T-Zellanteil ermittelt. Die Darstellung als relative Expansion (RE) ergibt sich aus dem direkten Vergleich von Proben die nur mit IL-2 stimuliert wurden und Proben, die mit IL-2+IPP inkubiert sind.

Die Proben der geimpften Patienten (Fig.10B) wurden, wie in 3.1.3 beschreiben, in mehrere zeitliche Abschnitte gruppiert. Nach der Impfung ließ sich zunächst keine Unterschied zur Kontrolle (RE= 2,5, Kontrolle) zeigen, erst nach etwa 1 Woche konnte eine erhöhte Proliferationsfähigkeit nachgewiesen werden (RE= 3,6, d6-21, Fig.10B).

Zusammenfassend zeigte sich bei den Masernpatienten über den Krankheitsverlauf eine reduzierte Proliferationsrate bei den γ/δ -T-Zellen, während bei Impfungen vorübergehend eine gesteigerte Proliferationsaktivität zu beobachten war.

3.6. In vitro Restimulation von Monozyten

Bei Untersuchungen zur Immunsupprimierung durch Masernviren, stellt sich die Frage, in welchem Maße die Funktionsfähigkeit der APCs beeinträchtigt ist. Für entsprechende Überprüfungen werden u.a. das als Endotoxin bezeichnete Lipopolysaccharid (LPS) der Zellwand gram-negativer Bakterien oder das synthetische Lipopeptid Pam₃CSK₄ eingesetzt. Beide reagieren über sogenannte Toll-like Rezeptoren (TLR) auf der Zelloberfläche der antigen-präsentierenden Zellen (APCs) oder bei Lymphozyten. Eine Aktivierung der APCs erfolgt bei LPS mittels TLR 4, während Pam₃CSK₄ den TLR 2 stimuliert. Nach Antigenkontakt der APCs mittels TLR kommt es zur Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine, u.a. Interleukin-6 (IL-6).

Zellen wurden wie unter 3.1.2 (Masernpatienten) bzw 3.1.3 (Impflinge) gewonnen und eingeteilt. 10⁵ PBMC von Masernpatienten (Fig. 11A) bzw Impflingen (Fig. 11B) wurden für 2-3 Stunden in einer 96-Loch-Flachbodenplatte inkubiert und danach mehrfach mit Medium gewaschen, so dass nur adhärenente Zellen wie Monozyten übrig blieben. Daraufhin wurden die Zellen entweder mit Medium allein inkubiert, oder mit definierten Mengen an LPS bzw PamCSK versetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium isoliert und die IL-6-Konzentration per ELISA bestimmt. Um etwaige Unterschiede der Monozytenzahl zu kompensieren, wurde der Monozytenanteil im FACS ermittelt und eine Normierung der Daten erfolgte.

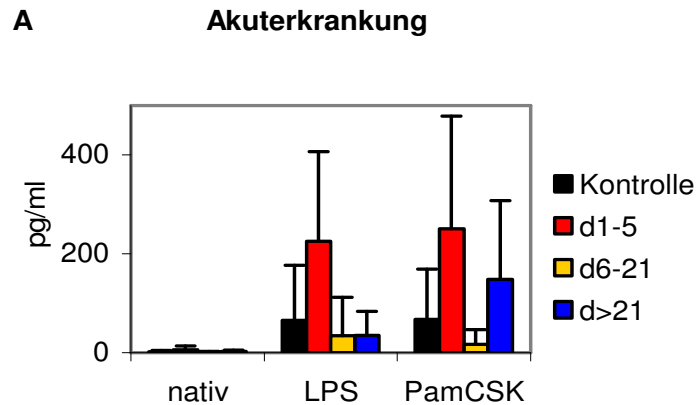


Fig. 11A Restimulation von Monozyten bei Masernpatienten nach TLR 2/4 Aktivierung.

Monozyten von gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) und Masernpatienten in verschiedenen Stadien der Erkrankung (d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, d>21= mehr als 21 Tage nach Exanthemauftritt) wurden entweder nur mit Medium (nativ), oder Medium mit dem bakteriellen Lipopolysaccharid LPS bzw dem synthetischen Lipopeptid Pam₃CSK₄ für 24h inkubiert und anschließend die IL6-Konzentration im Überstand mittels ELISA-Assay bestimmt.

Die unstimulierten Zellen der Masernpatienten wiesen <10pg/ml in allen Zeiträumen (nativ, Fig. 11A) auf. Nach Exposition mit Pam₃CSK₄, aber auch mit LPS, zeigten Proben im Akutstadium eine erhöhte Produktion von IL-6 (LPS, d1-5, Fig. 11A). So zeigte sich eine erhöhte IL-6 Produktion nach Exposition mit LPS (224,8±181pg/ml im Vergleich 129±219pg/ml in der Kontrollgruppe) bzw PamCSK stimulation (Pam, d1-5, Fig. 11A, 251±227,3pg/ml im Vergleich 67,8pg/ml±101 in der Kontrollgruppe).

In späteren Stadien der Erkrankung wurde eine tendenzielle Reduktion der IL-6-Produktion nachgewiesen. Dagegen konnte nach Pam₃CSK₄, mit Ausnahme der Intermediärphase eine andauernde Stimulation nachgewiesen werden mit 61,9pg/ml.

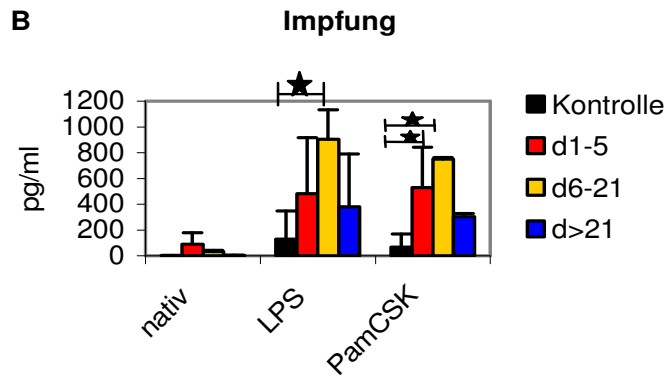


Fig. 11B Restimulation von Monozyten bei Impfungen nach TLR 2/4 Aktivierung.

Monozyten von Impfprobanden zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Impfung (Kontrolle= vor Impfung, d1-5= Tag 1-5 nach Impfung, d6-21= Tag 6-21 nach Impfung, d>21= mehr als 21 Tage nach Impfung) wurden entweder nur mit Medium (nativ), oder Medium mit dem bakteriellen Lipopolysaccharid LPS bzw dem synthetischen Lipopeptid Pam₃CSK₄ versetzt, für 24h inkubiert und anschließend die IL-6-Konzentration im Überstand mittels ELISA-Assay bestimmt.

Die Proben der Impflinge zeigten bereits bei Inkubation mit reinem Medium eine höhere IL-6-Produktion $5,5 \pm 7,6 \text{ pg/ml}$ (d1-5, Fig. 11B). Nach Exposition mit LPS bzw. PamCSK wurde für alle Stadien nach der Vakzinierung eine stark erhöhte IL-6-Produktion bestimmt. Mit LPS wurde Werte bis zu $906 \pm 226 \text{ pg/ml}$ ($p < 0,01$, d6-21, Fig. 11B) und mit PamCSK Werte über $527,8 \pm 314,1 \text{ pg/ml}$ ($p < 0,01$, d1-5, Fig. 11B) bis zu $749,5 \pm 14,8 \text{ pg/ml}$ ($p < 0,01$, d6-21, Fig. 11B) ermittelt.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Produktionskapazität für IL-6 nach Exposition der PBMC mit LPS und PamCSK bei den Masernpatienten insbesondere nach Stimulation durch PamCSK tendenziell anstieg, während bei Impfungen eine massive Erhöhung der IL6-Produktion, auch nach LPS Exposition, festgestellt wurde.

Die Datensätze zeigten eine relativ hohe Standardabweichung, die keine abschließende Aussage erlaubt. Weitere detaillierte Studien mit einer höheren Patienten- und Probenzahl sind in Zukunft erforderlich, um ein abschließendes Ergebnis zu erreichen.

3.7. Frequenz regulatorischer T-Zellen im Verlauf einer Maserninfektion und nach Vakzinierung

Die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) stellen eine Subpopulation von T-Zellen dar, die überschüssige Immunreaktionen kontrollieren. Sie supprimieren die zelluläre und humorale Immunreaktion. Natürliche T_{reg}-Zellen machen etwa 5-10% der CD4+

3. Ergebnisse

Lymphozyten aus. T_{reg} werden als $CD4^+$, $CD25^+$, $CTLA4^+$ Zellen in der FACS-Analyse identifiziert (s.2.2.3.2).

Kontrolle	gesunde Probanden (Kontrolle, n=3)
Akutphase	1- 6 Tage nach Auftreten des Exanths (d1-5, n=5)
Zwischenphase	1-3 Wochen nach Exanthe (d6-21, n=2)
Spätphase	> 3 Wochen nach Exanthe (d>21, n=3)

d1-5	Tag 1-5 nach Impfung	(d1-5, n=1)
d>67	mehr als 2 Monate nach Impfung	(d>67, n=1)

Proben von Masernpatienten in verschiedenen Stadien nach Infektion und von Impfungen wurden verglichen. Der prozentuale Anteil der Gesamt-T-Zellzahl wurde ermittelt. Ergebnisse sind in Fig. 12A/B zusammengefasst.

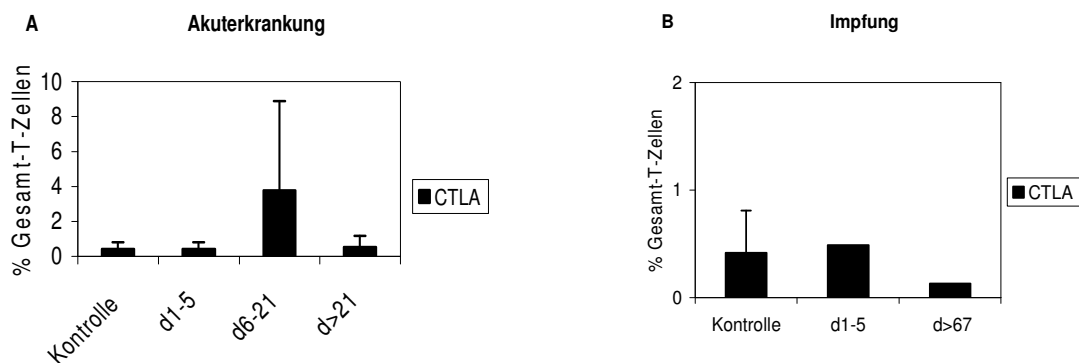


Fig. 12A/B Frequenz der natürlichen T_{reg} -Zellen nach Maserninfektion (A) und Impfung (B)

PBMC von gesunden Kontrollpersonen und Masernpatienten wurden durch intrazelluläre Dreifachfärbung auf $CD4^+$, $CD25^+$, $CTLA4^+$ Zellen untersucht. In der FACS-analyse wurde der Anteil auf $CD4^+$, $CD25^+$, $CTLA4^+$ Zellen von gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) und in den verschiedenen Stadien der Akuterkrankung (d1-5= Tag 1-5 nach Exanthemauftritt, d6-21= Tag 6-21 nach Exanthemauftritt, d>21= mehr als 21 Tage nach Exanthemauftritt, Fig. 12A) ermittelt sowie nach Impfung (d1-5= Tag 1-5 nach Impfung, d>67= 2Monate nach Impfung, Fig. 12B) und die Werte prozentual dargestellt werden.

Nach Maserninfektion ist lediglich in der Intermediärphase (d6-21) eine erkennbare Veränderung in der T_{reg} Zellzahl zu beobachten (Fig. 12A). Diese Ergebnisse jedoch sind nur tendenziell zu werten wegen der geringen Probenzahl.

3. Ergebnisse

Nach Impfung erwies sich der Anteil an T_{reg} Zellzahl im Vergleich mit der Kontrollgruppe als relativ stabil langfristig tendenziell fallend. Für die T_{reg} -Zellen kann wegen der geringen Probenzahl keine abschließende Aussage getroffen werden.

4. Diskussion

Akute Masern-Erkrankungen werden von einer generellen Immunsuppression begleitet; daher sind die Patienten der Gefahr von Superinfektionen ausgesetzt, die fatale Konsequenzen haben können. Als eine Hauptursache für die Suppression der Immunreaktivität wird eine ausgeprägte Lymphopenie und das Ausbleiben einer adäquaten T-Zell-vermittelten Immunantwort angesehen (von Pirquet, 1908; Tamashiro et al., 1987; Greenstein und McFarland, 1983; Fulginiti und Arthur, 1969; Arneborn und Biberfeld 1983; Hirsch et al., 1984; Wesley et al., 1978). Die vom Masern-Virus beeinflussten Faktoren und Parameter, die zur Suppression der zellulären Immunreaktion während der Masernerkrankung beitragen, sind neben der ausgeprägten Lymphopenie ein Zytokin-Ungleichgewicht (Griffin und Ward, 1993; Karp et al., 1996, Okada et al., 2001, Atabani et al., 2001) sowie eine generell reduzierte Proliferationskapazität der Lymphozyten (Yanagi, 1992; Schlender et al., 1997; Schnorr et al., 1997; Engelking et al., 1999) bzw. extensive Apoptose nicht-infizierter Lymphozyten (Okada et al., 2000) noch weitgehend ungeklärt. Die Immunreaktion, die durch den Impfvirus ausgelöst wird, ist deutlich milder (Li et al., 2001). Entsprechend treten nach einer Impfung keine opportunistischen Infektionen auf (Okada et al., 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auf den Nachweis der Leukopenie im Verlauf der Erkrankung verzichtet. Stattdessen wurden *ex vivo* sowohl verschiedene Subpopulationen von PBMCs als auch Faktoren der zellulären Immunreaktion nach einer Masern-Infektion und nach einer Masern-Vakzinierung vergleichend untersucht. Dabei wurden zunächst frühere Befunde (Ward and Griffin, 1993) bestätigt, die darauf hinweisen, daß in beiden Fällen das PBMC-Kompartiment in seiner Zusammensetzung stabil bleibt; d.h. von der Lymphopenie sind alle Subpopulationen betroffen. Auch die Regeneration scheint zeitgleich zu verlaufen. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Okada et al (2000), die bei MV-Infektion eine verstärkte NK-Aktivität und – Proliferation nachweisen konnten.

Bei der differentiellen Untersuchung von verschiedenen T-Zell-Subpopulationen im Verlauf einer Infektion bzw. nach einer Vakzinierung ergaben sich aber z.T. sehr charakteristische Veränderungen. Die Unterscheidung von verschiedenen T-Zell-Subpopulationen erfolgt auf der Basis charakteristischer CD-Proteine, deren Expression als Marker angesehen wird. Zur Aktivierung von T-Zellen kann neben der Interaktion des TCR/CD3-Komplexes mit einem antigen-präsentierenden MHC-Protein als

Zweitsignal nicht nur CD28/B7 dienen, sondern auch CD54 mit dem Adhäsionspartner CD11a (Chirathaworn et al., 2002). Bei der Untersuchung von CD54 exprimierenden T-Zellen wurde sowohl nach Infektion als auch nach Impfung eine kontinuierliche Erhöhung des Anteils dieser Zellen beobachtet; nach ca. 3 Wochen hatte sich der Anteil an CD54⁺-Zellen fast verdoppelt (Fig.4, 5). CD54, das sogenannte „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1), ist ein Transmembran-Glycoprotein der Immunoglobulin-Superfamilie und gilt als essentielle Komponente bei vielen immunologischen Prozessen, wie die T-Zell-Aktivierung und der Leukozyten-Rekrutierung (Slich et al., 1993). CD11a, das „lymphocyte function-associated antigen-1“ (LFA-1), das u.a. auf APCs exprimiert wird, gehört zu Familie der Integrine und spielt eine entsprechende Rolle bei Zell/Zell-Assoziationen (Soilu-Hanninen et al., 1996, Salomon et al., 1998). So bedingt eine Aktivierung des TCR/CD3 Komplexes der T-Zellen über intrazelluläre Signale eine Konformationsänderung von LFA-1; dies führt zu einer Erhöhung der Affinität für spezifische Liganden wie ICAM und führt letztendlich zur Leukozyten-Aktivierung.

Der bereits in der Kontrollgruppe deutlich erhöhte Anteil an CD54⁺- und CD11a⁺- bei γ/δ -Zellen stieg im Vergleich zu den α/β -T-Zellen im Verlauf der MV-Infektion weiter an (Fig 4A/B). Entsprechende Veränderungen wurden auch nach der Impfung beobachtet. Dieser Befund steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Nanan et al. (1999). Der Anteil der α/β -T-Zellen nahm dagegen im Verlauf der Infektion signifikant ab, blieb aber nach Impfung unverändert. Eine vergleichbare Aktivierung der γ/δ -T-Zellen wurde auch während einer Infektion durch Mykobakterium tuberculosis (Behr-Perst et al., 1999) beobachtet. In Anbetracht der Rolle von ICAM-1 als Kostimulator bei der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen (Chirathaworn et al, 2002) ist die kontinuierliche Zunahme des Anteils an CD54⁺ Zellen nach der Infektion und der Impfung als eine adäquate Reaktion des Immunsystems anzusehen. Durch aktivierte γ/δ -T-Zellen wird neben einer direkten antiviralen Aktivität die adaptive Immunreaktion der α/β -T-Zellen beeinflusst. Der Anteil an T-Zellen mit CD11a, dem Bindungspartner von ICAM-1, blieb dagegen sowohl nach Infektion als auch nach Impfung weitgehend konstant. Induktion von CD11a hat sich bei Infektion mit verschiedenen Virusstämmen als unterschiedlich erwiesen (Hummel et al., 1998). Virus-stamm spezifische Unterschiede sind ebenfalls bei der ICAM-1 Induktion bekannt (Harcourt et al., 1999)

Die Untersuchungen der beiden sequentiell exprimierten Aktivierungsmarker von T-Zellen, CD69 und CD25, hat zu auffälligen Befunden geführt. Es hat sich gezeigt, dass nach Infektion und nach Vakzinierung der Anteil an CD69-positiven Zellen rasch abnahm und auf fast ein Drittel zurückging; das galt insbesondere für die γ/δ -Zellen, bei denen die CD69-Zellen unter Kontrollbedingungen ca. 35% ausmachen (Fig. 6, 7). CD69 wird unmittelbar nach einer Aktivierung von Lymphozyten exprimiert. Es ist bereits 30-60 Minuten nach der Stimulation auf der Oberfläche nachweisbar und wird für etwa zwei Tage von allen aktivierten T-Zellen exprimiert; CD69 bewirkt eine Aufrechterhaltung der T-Zell-Aktivierung. Das Membranprotein CD69 dient als Signalrezeptor bei der Aktivierung von T-Zellen. Es spielt u.a. als ko-stimulierendes Molekül eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Lymphokin-Sekretion (Borrego et al., 1999); daher wird es auch als „activation inducer molecule“ (AIM) bezeichnet. Es wäre vorstellbar, daß aufgrund der reduzierten Zahl an CD69-positiven Zellen die Proliferationsrate vermindert ist und so weniger T-Zellen generiert werden; dies könnte als eine der Ursachen für Leukopenie bei Masernerkrankung in Betracht kommen. Die Ursachen und Mechanismen für die rasche Abnahme des Anteils an CD69-Zellen sind nicht geklärt. Eine Reduzierung der CD69 Expression wurde in Lymphozyten-Kulturen nach Exposition mit Mycotoxin beobachtet (Johannisson et al., 1999). Außerdem wurde bei einer Behandlung mit einem Inhibitor der Janus kinase (JAK3) eine erheblich reduzierte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 ermittelt (Saemann et al., 2003). Ob entsprechende Signalwege auch an der durch MV-induzierten Inhibition der CD69 Expression beteiligt sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Etwa 1-2 Tagen später als CD69 erscheint auf den T-Zellen der Aktivierungsmarker CD25, die α -Untereinheit des Interleukin-2 Rezeptors. Die vorliegenden Befunde ergaben einen relativ konstanten Anteil an CD25-positiven T-Zellen nach Infektion und Impfung. Diese Beobachtung bestätigt frühere Befunde von Nanan et al. (1999). Eine Suppression der CD25 Expression im Verlauf einer Masernerkrankung wie sie von Addae et al (1998) bzw. Bell et al (1997) beschrieben wurden, konnte nicht beobachtet werden. Die vorbeschriebene Hochregulierung von CD25 nach Maserninfektion (Ward et al., 1991) bzw. nach einer Vakzinierung (Ovsyannikova et al., 2003) konnte nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist *in vivo* eine Hochregulierung von CD25 nicht effizient oder es wurde eine zunehmende Zahl von regulatorischen T-Zellen nachgewiesen.

Die Typ1-Interferone (IFN- α und IFN- β) werden von virus-befallenen Zellen sezerniert; sie aktivieren so parakrin in den umliegenden Zellen über Typ1-Interferon-Rezeptoren den Jak/STAT-Signaltransduktionsweg und induzieren auf diesem Wege die Expression bestimmter Gene, die eine parakrine Virusvermehrung in diesen Zellen verhindert (Stark et al., 1996, Yokota et al., 2003). Diese Mechanismen tragen dazu bei, die weitere Verbreitung des Virus einzudämmen. Die indirekte, quantitative Bestimmung der Konzentration von Typ1-IFN im Serum ergab eine kontinuierliche Abnahme des IFN-Titers im Verlauf der Masernerkrankung (Fig. 8). Die Ursachen für diese Abnahme der IFN-Konzentration nach Infektion mit dem Masern-Virus sind nicht bekannt. Insgesamt sind die bisherigen Befunde hinsichtlich einer Änderung des Serum-Titers an Typ1-IFN bei einer Exposition mit Wildtyp- bzw. Vakzine-Viren recht widersprüchlich. Einige Daten sprechen für eine verstärkte Biogenese von Typ1-IFN nach Vakzinierung (Petralli et al., 1965) bzw. bei akuter Infektion (Crespi et al., 1988), während in anderen Untersuchungen keine Hinweise für Konzentrationsänderungen von Typ1-IFN im Serum von Impf-Probanden (Tilles et al., 1987) oder Masernpatienten (Shiozawa et al., 1988) gefunden wurden. Entsprechend widersprüchlich sind die Ergebnisse von *in vitro* Studien; einerseits wurde in Studien über die Sekretion von Typ1-IFN berichtet (Volckaert-Vervliet et al., 1977) andererseits über die Suppression der IFN-Induktion (Naniche et al., 2000). Die Unterschiede der *in vitro* Daten sind u.U. auf unterschiedliche Zelllinien und Viruspräparationen zurückzuführen. Dafür könnte die Beobachtung von Naniche et al. (2000) sprechen; es wurde gezeigt, dass über PBMC oder die Zelllinie 95-8 gezogene MV-Viren die IFN-Induktion unterdrücken. Virus-Isolate, die wiederholt über Verozellen gezogen wurden, hatten diese Eigenschaft verloren, wie die Vakzinestämme. Man geht davon aus, daß Verozellen aufgrund eines Defekts kein IFN produzieren, so daß in diesen Zellen kein Selektionsdruck für die Amplifikation eines IFN-unterdrückenden Virustyps besteht. Insgesamt wird davon ausgegangen, daß Viren verschiedene Mechanismen entwickelt haben, die dem antiviralen Effekt von IFN entgegen wirken, eine davon ist offenbar die Suppression der IFN-Produktion (Garcia-Sastre et al., 2002, Naniche et al., 2000). Da Typ-I-Interferone als zentrale Elemente der frühen nicht-spezifischen Immunantwort gelten, ist die im Rahmen dieser Studie ermittelte Reduktion des IFN-Spiegels als eine gravierende Schwächung des Immunsystems anzusehen. Studien an Maus-Linien haben gezeigt, daß eine Blockierung der Typ1-IFN Antwort die Immunreaktion erheblich beeinträchtigt und zu einer massiven Virus-Replikation führt (Müller et al., 1994). Entsprechend ist

spekuliert worden, ob das Ausmaß einer Beeinträchtigung der IFN-Synthese, die Virulenz eines bestimmten Virus-Stamm widerspiegelt (Naniche et al., 2000).

Die Ermittlung der durch mitogene Stimuli induzierten Proliferationsrate von T-Zellen ergab bei Masernpatienten in der Zwischenphase eine deutlich reduzierte Proliferationskapazität (Fig. 9). Diese Ergebnisse bestätigen frühere Befunde, die zeigten, daß Lymphozyten aus dem Blut von Patienten während und nach der akuten Masern-Infektion eine verminderte Proliferationsreaktion aufweisen (Borrow and Oldstone, 1995; Schneider-Schaulies and ter Meulen, 1999). In vielen, aber nicht allen Studien wurde ein eingeschränktes Proliferationsverhalten *in vitro* von Lymphozyten nach Immunisierung mit MMR beschrieben (Munyer et al., 1975, Smedman et al., 1994). In der vorliegenden Studie ergaben sich Hinweise auf unverändertes Proliferationsverhalten der T-Zellen nach Vakzinierung. Die Variationen zwischen den verschiedenen Studien könnten u.a. durch Altersunterschiede zum Zeitpunkt der Impfung, Zeitpunkte der Analyse nach Immunisierung oder populationsbedingte Unterschiede bedingt sein. Obwohl es Hinweise für eine MV-induzierte Blockierung des Zell-Zyklus gibt (Yanagi, 1992) sprechen einige Indizien dafür, daß die reduzierte Proliferationsreaktion bei Applikation von mitogenen Stimuli nicht auf direkt infektiionsabhängige Reaktionen zurückzuführen ist. Stattdessen werden indirekte Mechanismen diskutiert, wie die Freisetzung von löslichen Inhibitoren, eine verminderte Abgabe von Interleukin-12 oder durch Zell-Kontakte vermittelte negative Signalprozesse in Lymphozyten (Sun et al., 1998; Fujinami et al., 1998).

Bei der Subpopulation der $\gamma\delta$ -Zellen konnte bei MV-Infektion eine Reduktion der Proliferationskapazität dargestellt werden (Fig. 10). Die $\gamma\delta$ -Zellen spielen als Elemente der „ersten Abwehr-Linie“ bei sehr vielen Erkrankungen eine wichtige Rolle, allerdings sind die Mechanismen ihrer Aktivierung noch weitgehend unklar. Es ist aber davon auszugehen, daß sie von anderen Liganden aktiviert werden als die $\alpha\beta$ -Zellen (Bluestone et al., 1995, Chien et al., 1996). Generell reagiert die Subpopulation der $\gamma\delta$ -Zellen auf Stimuli mit einer raschen und signifikanten Proliferation. *In vitro* Versuche konnten zeigen, dass $\gamma\delta$ -Zellen durch direkten Kontakt mit dem MV-F/H-Glykoprotein Komplex auf T-Zellen oder Monozyten in ihrer Proliferationsfähigkeit deutlich eingeschränkt werden, nicht jedoch bei Kontakt mit infizierten DCs oder B-Zellen (Bieback et al, 2003). Die vorliegenden Befunde ergaben für Masernpatienten in den ersten Phasen des Krankheitsverlaufes eine Abnahme der Proliferationskapazität der $\gamma\delta$ -Zellen; nach einer Impfung wurden keine signifikanten Änderungen der

Proliferationsraten festgestellt. Diese Befunde sprechen dafür, daß der nach einer Infektion mit Masern-Viren auftretende Verlust an Proliferationsaktivität bei den Lymphozyten des peripheren Blutes offenbar alle T-Zell-Typen trifft.

Die Funktionsfähigkeit der APC konnte nach einer akuten Maserninfektion zwar nachgewiesen werden, allerdings war die Produktion von IL-6 deutlich geringer als nach Vakzinierung (Fig. 11A/B). Wir gehen von einer Desensibilisierung der Monozyten nach Kontakt des Masernvirus mit TLR aus, was in einer eingeschränkten Produktion von IL-6 nach TLR2/4 Stimulation resultiert. Im Gegensatz dazu ist der attenuierte MV-Stamm kein TLR-Agonist, damit ist eine Stimulation der Monozyten möglich.

Die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) spielen eine wichtige Rolle bei der Vermeidung überschüssiger Immunreaktionen; sie supprimieren die zelluläre und humorale Immunreaktion (Dieckmann et al., 2001, Takahashi et al., 2000, Maloy et al., 2003). Ein Vergleich der Proben von Masernpatienten hat gezeigt, dass der Anteil der $CD4^+/CD25^+/CTLA4^+$ T-Zellen im Verlauf einer Woche nach Exanthemauftritt deutlich anstieg; ein höheres Niveau an T_{reg} -Zellen blieb für etwa zwei Wochen erhalten. Diese ersten Befunde sprechen für eine mögliche Rolle der T_{reg} -Zellen auch bei Masern-Infektionen. Um konkretere Aussagen über das Verhalten von T_{reg} -Zellen im Verlauf der Masern-Virus-Infektion machen zu können, müssen umfangreichere Versuchsreihen mit grösseren Probandenzahlen durchgeführt werden. Die relativ wenigen Einzelbefunde erlauben noch keine klaren Aussagen bezüglich des Verhaltens und der Funktion von T_{reg} -Zellen bei viralen Infektionen bzw. nach einer Vakzinierung. Weitergehende Forschungsprojekte könnten bezüglich dieser wichtigen T-Zell-Subpopulation neue und im Hinblick auf ein Gesamtverständnis der T-Zell-Populationen sehr bedeutsame Erkenntnisse liefern.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Addae MM, Komada Y, Zhang XL, Sakurai M 1995. Immunological unresponsiveness and apoptotic cell death of T cells in measles virus infection. 37:308-14.
- Addae MM, Komada Y, Taniguchi K, Kamiya T, Osei-Kwasi M, Akanmori BD, Nkrumah FK 1998. Surface marker patterns of T cells and expression of interleukin-2 receptor in measles infection. 40:7-13
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol 2:675-680.
- Arneborn P, Biberfeld G. 1983. T lymphocyte subpopulations in relation to immunosuppression in measles and varicella. Infect Immun 39:29-37.
- Atabani SF, Byrnes AA, Jaye A, Kidd IM, Magnusen AF, Whittle H, Karp CL. 2001. Natural measles causes prolonged suppression of interleukin 12 production. J Infect Dis 184:1-9.
- Autran B, Triebel F, Katlama C, Rozenbaum W, Hercend T, Debre P. 1989. T cell receptor gamma/delta⁺ lymphocyte subsets during HIV infection. Clin Exp Immunol 75:206-10
- Avota E, Avots A, Niewiesk S, Kane LP, Bommhardt U, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. 2001. Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. Nat Med 7:725-731.
- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392:245-252.
- Behr-Perst SI, Munk ME, Schaberg T, Ulrichs T, Schulz RJ, Kaufmann SHE. 1999. Phenotypically activated $\gamma\delta$ T Lymphocytes in the peripheral blood of patients with Tuberculosis. J Inf Dis 180:141-149
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. 2002. CD4⁺CD25⁺regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. Nature 420:502-507.
- Bell AF, Burns JB, Fujinami RS 1997. Measles virus infection of human T cells modulates cytokine generation and IL-2 receptor alpha chain expression. Virology 232:241-247

- Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, Wagner H, Kirschning CJ, Ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. 2002. Hemagglutinin protein of wild-type measles activates Toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* 76:8729-8736
- Bieback K, Breer C, Nanan R, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. 2003. Expansion of human $\gamma\delta$ T cells in vitro is differentially regulated by the measles virus glycoproteins. *J Gen Virol* 84:1179-1188
- Bluestone JA, Khattry R, Sciammas R, Sperling AI. 1995. TCR gamma delta cells: a specialized T-cell subset in the immune system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:307-353.
- Blumberg RW, Cassady HA, 1947. Effect of measles on the nephrotic syndrome. *Am J Dis Child* 63:151-166.
- Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J, Solana R. 1999. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunol* 97:159-165.
- Borrow P, Oldstone MBA. 1995. Measles virus-mononuclear cell interactions p51-64. in M.Billeter and V.ter Meulen (ed), *Measles virus*. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany
- Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB. 1994. Recognition and destruction of virus-infected cells by human gamma delta CTL. *J Immunol* 153:5133-40.
- Carding SR, Egan PJ. 2000. The importance of $\gamma\delta$ T cells in the resolution of pathogen-induced inflammatory immune responses. *Immunol Rev* 173:98-108.
- Casares N, Arribillaga L, Sarobe P, Dotor J, Lopez-Diaz de Cerio A, Melero I, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ. 2003. CD4/CD25⁺ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4⁺ T cells with IFN γ - dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination. *J Immunol* 171:5931-9.
- Chien YH, Jores R, Crowley MP. 1996. Recognition by $\gamma\delta$ -T-cells. *Annu Rev Immunol* 14:511-32.
- Chirathaworn C, Kohlmeier JE, Tibbetts SA, Rumsey LM, Chan MA, Benedict SH. 2002. Stimulation through intercellular adhesion molecule-1 provides a second signal for T cell activation. *J Immunol* 168:5530-5537.
- Clements CJ, Cutts FT. 1995. The epidemiology of measles: thirty years of vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol*. 191:13-33.

- Crespi M, Struthers JK, Smith AN, Lyons SF. 1988. Interferon status after measles infection. *S Afri Med J* 73:711-712.
- De Libero G. 1997. Sentinel function of broadly reactive human $\gamma\delta$ T cells. *Immunol today* 18:22-26.
- De Maria A, Ferrazin A, Ferrini S, Ciccone E, Terragna A, Moretta L. 1992. Selective increase of a subset of T cell receptor gamma delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 165:917-9.
- De Paoli, Gennari D, Martelli P, Cavarzerani V, Comoretto R, Santini G 1990. Gamma delta T cell receptor bearing lymphocytes during Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 161:1013-1016.
- De Paoli P, Gennari D, Martelli P, Basaglia G, Crovatto M, Battistin S, Santini G. 1991. A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 83 :187-91.
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193:1303-1310.
- Doerig R, Marcil A., Chopra A., Richardson CD. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75:295-305.
- Duclos P, Ward BJ. 1998. Measles vaccine: a review of adverse events. *Drug Saf.* 19:435-454
- Engelking O, Fedorov LM, Lilischkis R, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. 1999. Measles virus-induced immunosuppression in vitro is associated with deregulation of G1 cell cycle control proteins. *J Gen Virol* 80:1599-1608.
- Enders JF. 1962. Measles virus: historical review, isolation and behaviour in various systems. *Am J Dis Child* 103, 282-287.
- Fields BN, Knipe DM, Channock RM. 1990. *Virology* 2nd edn. New York. Raven Press, 2011-54.
- Fujinami RS, Sun X, Howell JM, Jenkin JC, Burns JB. 1998. Modulation of immune system function by measles virus infection: role of soluble factor and direct infection. *J Virol* 72:9421-27.
- Fulginiti VA, Arthur JH. 1969. Altered reactivity to measles virus. *J Pediatr* 75:609-616.

- Gans HA. 2001. Immune response to measles+mumps vaccination of infants 6,9,12 months old. *J Inf Dis* 184:817-826.
- Garcia-Sastre A. 2002. Mechanisms of inhibition of the host interferon α/β -mediated antiviral responses by viruses. *Microbes Infect* 4:647-655.
- Greenstein JI, McFarland HF. 1983. Response of human lymphocytes to measles virus after natural infection. *Infect Immun* 40:198-204.
- Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT, Vaisberg A. 1989. Immune activation in measles. *N Engl J Med* 320:1667-72.
- Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT, Vaisberg A. 1990. Immune activation during measles: interferon-gamma and neopterin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease. *J Inf Dis* 161:449-453.
- Griffin DE, Ward BJ, Juaregui E, Johnson RT, Vaisberg A. 1992. Immune activation during measles: beta-2-microglobulin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated cases. *J infect Dis* 166:1170-1173.
- Griffin DE, Ward BJ. 1993. Differential CD4 T cell activation in measles. *J Inf Dis* 168:275-281.
- Griffin DE. 1995. Immune responses during measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 191: 117-134.
- Harcourt BH, Rota PA, Hummel KB, Bellini WJ, Offermann MK. 1999. Induction of intercellular adhesion molecule 1 gene expression by measles virus in human umbilical vein endothelial cells. *J Med Virol* 57:9-16.
- Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. 2001. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol* 75:10730-7.
- Hirsch RL, Griffin DE, Johnson RT, Cooper SJ, Lindo de Soriano I, Roedenbeck S, Vaisberg A. 1984. Cellular immune responses during complicated and uncomplicated measles virus infections of man. *Clin Immunol Immunopathol* 31:1-12.
- Hummel KB, Bellini WJ, Offermann MK 1998. Strain-specific differences in LFA-1 induction on measles virus-infected monocytes and adhesion and viral transmission to endothelial cells. *J Virol* 72:8403-8407.

- Hussey GD, Goddard EA, Hughes J, Ryon JJ, Kerran M, Carelse E, Strebel PM, Markowitz LE, Moodie J, Barron P, Latief Z, Sayed R, Beatty D, Griffin DE. 1996. The effect of Edmonston-Zagreb and Schwarz measles vaccines on immune responses in infants. *J Infect Dis* 173:1320-6.
- Johannisson A, Bjorkhag B, Hansson W, Gadhasson IL, Thuvander A. 1999. Effects of four trichothecene mycotoxins on activation marker expression and cell proliferation of human lymphocytes in culture. *Cell Biol Toxicol* 15:203-215.
- Joshi SB, Dutch RE, Lamb RA. 1998. A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV gp41. *Virology* 248:20-34.
- Kaufmann SHE. 1996. $\gamma\delta$ and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *PNAS* 93:2272-2279.
- Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL, Miller SD, Bluestone JA. 1996. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 184:783-8.
- Karp CL, Wysocka M, Wahl LM, Ahearn JM, Cuomo PJ, Sherry B, Trinchieri G, Griffin DE. 1996. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by MV. *Science* 273:228-231.
- Kato Y, Tanaka Y, Tanaka H, Yamashita S, Minato N. 2003: Requirement of species-specific interactions for the activation of human $\gamma\delta$ -T-cells by pamidronate. *J Immunol* 170:3608-3613.
- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1:398-401.
- Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Berge F, Potaux L, Moreau JF, Dechanet-Merville J. 2001. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 184:533-41.
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 271:1734-6.
- Li H, Hickman CJ, Helfand RF, Keyserling H, Anderson LJ, Bellini WJ 2001. Induction of cytokine mRNA in peripheral mononuclear cells of infants after the first dose of measles vaccine. *Vaccine* 19:4896-4900

- Luhder F, Chambers C, Allison JP, Mathis D. 2000. Pinpointing when T cell costimulatory receptor CTLA-4 must be engaged to dampen diabetogenic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 24:12204-9.
- Maccario R, Revello MG, Comoli P, Montagna D, Locatelli F, Gerna G. 1993. HLA-unrestricted killing of HSV-1 infected mononuclear cells. Involvement of either gamma/delta⁺ or alpha/beta⁺ human cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 150:1437-45.
- Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. 2003. CD4⁺CD25⁺ T_R cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 197 :111-119.
- Menezes J, Leibold W, Klein G, Clements G. 1975. Establishment and characterization of Epstein-Barr Virus (EBV) negative blastoid B cell line (BJAB) from an exceptional EBV-genome-negative African Burkitt's lymphoma. *Biomedicine* 22:276-84.
- Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Immunol* 1:135-145.
- Moss WJ, Cutts F, Griffin DE. 1999. Implications of the human immunodeficiency virus epidemic for control and eradication of measles. *Clin Infect Dis* 29:106-112
- Moss WJ, Clements CJ, Halsey NA. 2003. Immunization of children at risk of infection with human immunodeficiency virus. *Bull World Health Organ* 81:61-70
- Munyer, TP., Mangi RJ, Dolan T, Kantor FS. 1975. Depressed lymphocyte function after measles-mumps-rubella vaccination. *J. Infect. Dis.* 132:75-78.
- Müller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264:1918-1921.
- Nanan R, Chittka B, Hadam M, Kreth HW. 1999. Measles virus infection causes transient depletion of activated T cells from peripheral circulation. *J Clin Virol* 12:201-210.
- Naniche D, Variator-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D. 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67:6025-6032.
- Naniche D, Yeh A, Eto D, Manchester M, Friedman RM, Oldstone MB. 2000. Evasion of host defenses by MV: Wild-type measles virus infection interferes with induction of alpha/beta interferon induction. *J Virol* 74:7478-7484.

- Niewiesk S, Eisenhuth I, Fooks A, Clegg JC, Schnorr JJ, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. 1997. Measles virus-induced immune suppression in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) model depends on viral glycoproteins. *J Virol* 71:7214-7219.
- Okada H, Kobune F, Sato TA, Kohama T, Takeuchi Y, Abe T, Takayama N, Tsuchiya T, Tashiro M. 2000. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute MV. *Arch Virol* 145:905-920.
- Okada H, Sato TA, Katayama A, Higuchi K, Shichijo K, Tsuchiya T, Takayama N, Takeuchi Y, Abe T, Okabe N, Tashiro M. 2001. Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccine. *Arch Virol* 146:859-874.
- Oldstone MBA. 1996. Virus-lymphoid cell interactions. *PNAS* 93:12756-12758.
- Ovsyannikova IG, Reid KC, Jacobson RM, Oberg AL, Klee GG, Poland GA. 2003. Cytokine production patterns and antibody response to measles vaccine. *Vaccine* 21:3946-3953.
- Perrin PJ, Maldonado JH, Davis TA, June CH, Racke MK. 1996. CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 157:1333-6.
- Petralli JK. 1965. Circulating interferon after measles vaccination. *N Engl J Med* 273:198-201.2
- Rager-Zisman B, Bazarsky E, Skibin A, Chamney S, Belmaker I, Shai I, Kordysh E, Griffin DE. 2003. The effect of measles- mumps- rubella (MMR) immunization on the immune response of previously immunized primary school children. *Vaccine* 21:2580-2588.
- Rall GF. 2003. Measles virus 1998-2002: progress and controversy. *Annu Rev Microbiol* 57:343-67.
- RKI, 2004. www.rki.de/cIn_038/nn_225576/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__Masern.html
- Riley EC, Murphy G, Riley RL. 1978. Airborne spread of measles in a suburban elementary school. *Am J Epidemiol* 107:421-432.
- Saemann MD, Zeyda M, Diakos C, Szekeres A, Bohmig GA, Kelemen P, Parolini O, Stockinger H, Prieschl EE, Stulnig TM, Baumruker T, Zlabinger GJ. 2003. Suppression of early T-cell-receptor-triggered cellular activation by the janus kinase 3 inhibitor WHI-P-154. *Transplantation* 75:1864-722.

- Salomon B, Bluestone JA. 1998. LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J Immunol* 161:5138-5142.
- Samuel O, Shai Y. 2001. Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses. *Biochemistry* 40:1340-1349.
- Sanchez-Lanier M, Guerin P, McLaren LC, Bankhurst AD. 1988. Measles virus-induced suppression of lymphocyte proliferation. *Cell Immunol* 116:367-381.
- Schlender J, Schnorr JJ, Spielhoffer P, Cathomen T, Cattaneo R, Billeter MA, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. 1996. Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *PNAS* 93:13194-13199.
- Schneider-Schaulies S, Kreth HW, Hofmann G, Billeter M, Ter Meulen V. 1991. Expression of measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE and autoimmune diseases. *Virology* 182:703-711.
- Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. 1999. Measles virus induced immunosuppression. *Nova Acta Leopoldina* 307:1-13.
- Schneider-Schaulies S, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J, ter Meulen V. 2001. Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr Mol Med* 1:163-182.
- Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. 2002. Measles virus and immunomodulation: molecular bases and perspectives. *Exp Rev in Mol Med* 1-16.
- Schnorr JJ, Seufert M, Schlender J, Borst J, Johnston IC, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. 1997. Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression in vitro. *J Gen Virol* 78:3217-3226.
- Schnorr JJ, Cutts FT, Wheeler JG, Akramuzzaman SM, Alam MS, Azim T, Schneider-Schaulies S, ter-Meulen V. 2001. Immune modulation after measles vaccination of 6-9-months old Bangladeshi infants. *Vaccine* 19,1503-1510.
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. 2002. Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunol* 03,no2.
- Shiozawa S, Yoshikawa N, Iijima K, Negishi K. 1988. A sensitive radioimmunoassay for circulating alpha-interferon in the plasma of healthy children and patients with measles virus infection. *Clin Exp Immunol* 73:366-9.

- Sligh JE Jr, Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL. 1993. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule-1. *PNAS* 90:8529-33.
- Smedman L, Joki A, da Silva AP, Troye-Blomberg M, Aronsson B, Perlmann P. 1994. Immunosuppression after measles vaccination. *Acta paediatr* 83:164-8.
- Smith KA. 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240:1169-1176.
- Soilu-Hanninen M, Hanninen A, Ilonen J, Salmi A, Salonen R. 1996. Measles virus hemagglutinin mediates monocyte aggregation and increased adherence to measles-infected endothelial cells. *Med Microbiol Immunol* 185:73-80
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. 1996. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-64.
- Sun X, Burns JB, Howell JM, Fujinami RS. 1998. Suppression of antigen-specific T cell proliferation by measles virus infection: role of soluble factor in suppression. *Virology* 246:24-33.
- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Sakaguchi S. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192:303-309.
- Tamashiro VG, Perez HH, Griffin DE. 1987. Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during complicated and uncomplicated measles. *Pediatr Infect Dis J* 6:451-454.
- Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406:893-897.
- Tetteh JK, Addae MM, Ishiwada N, Yempewu SM, Yamaguchi S, Ofori-Adjei D, Kamiya Y, Akanmori BD 2003. Plasma levels of Th1 and Th2 cytokines in Ghanaian children with vaccine-modified measles. *Eur Cytokine Netw* 14:109-113
- Tilles JG, Balkwill F, Davilla J. 1987. 2',5'-Oligoadenylate synthetase and interferon in peripheral blood after rubella, measles, or mumps live virus vaccine. *Proc Soc Exp Biol Med* 186:70-74.

- Vahlenkamp TW, Tompkins MB, Tompkins WA. 2005. The role of CD4+CD25+ Regulatory T cells in viral infections. *Vet Immunol Immunopathol* 108:219-25.
- Volckaert-Vervliet G. 1977. Induction of interferon in human lymphoblastoid cells infected with measles virus. *J Gen Virol* 41:459-466.
- Von Pirquet C. 1908. Das Verhalten der kutanen Tuberkulinreaktion während der Masern. *Dtsch Med Wochenschr* 34:1297-300.
- Ward BJ, Johnson RT, Vaisberg A, Jauregui E, Griffin DE. 1991. Cytokine production In vitro and the lymphoproliferative defect of natural measles virus infection. *Clin Immunol Immunopathol* 61:236-48
- Ward BJ, Griffin DE. 1993. Changes in cytokine production after measles virus vaccination: Predominant production of IL-4 suggests induction of a Th2 response. *Clin Immunol Immunopathol* 67:171-177.
- Weidmann A, Fischer C, Ohgimoto S, Ruth C, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. 2000. Measles virus-induced immunosuppression in cotton rats in vitro is independent of complex glycosylation of viral glycoproteins and of hemifusion. *J Virol* 74:7548-7553.
- Wesch D, Marx S, Kabelitz D. 1997. Comparative analysis of alpha beta and gamma delta T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate. *Eur J Immunol* 27:952-6.
- Wesley A, Coovadia HM, Henderson L. 1978. Immunological recovery after measles. *Clin Exp Immunol* 32:540-544.
- WHO. 2003. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/>
- Yanagi Y. 1992. Measles virus inhibits mitogen-induced T cell proliferation but does not directly perturb the T cell activation process inside the cell. *Virol* 187:280-289.
- Yokota S, Saito H, Kubota T, Yokosawa N, Amano K, Fujii N. 2003. Measles virus suppresses interferon- α signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon- α receptor complex. *Virol* 306:135-146.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine vergleichende Analyse von verschiedenen immunologisch relevanten Parametern im Verlauf einer Masern-Erkrankung bzw. nach einer Masern-Vakzinierung im Hinblick auf ein Verständnis der Ursache für die mit einer Masern-Infektion einhergehende Immunsuppression. Dabei wurden Blutproben von Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Auftreten des Exanthems bzw. nach der Impfung untersucht.

Zunächst konnte in einer quantitativen Analyse aufgezeigt werden, dass im Rahmen der auftretenden Leukopenie, der prozentuale Anteil distinkter Zelltypen, wie B-, NK-, α/β - und γ/δ -T-Zellen, sowie Monozyten und dendritische Zellen (DCs), sowohl bei Patienten mit akuter Masern-Erkrankung, als auch nach einer Masern-Impfung weitgehend konstant blieb.

Für eine Erfassung des Aktivierungsgrades von α/β - und γ/δ -T-Zellen wurde der jeweilige Anteil CD11a-, CD54-, CD69- und CD25-exprimierender CD3-positiver Zellen bei Masernpatienten und Impfungen bestimmt. Dabei ergab sich generell in allen o.g. Untersuchungen für γ/δ -T-Zellen auf der Basis distinkter Aktivierungsmarker ein höherer Prozentsatz positiver Zellen als für α/β -T-Zellen. Es konnte sowohl für α/β -T-Zellen, als auch für γ/δ -T-Zellen ein erhöhter Prozentsatz CD54 (ICAM-1)-exprimierender Zellen und ein deutlich geringerer Anteil CD69-exprimierender α/β -T-Zellen gezeigt werden. Diese Unterschiede blieben über den gesamten Zeitraum (d21 nach Vakzinierung bzw. post Exanthem) erhalten. Desweiteren konnte bei den γ/δ -T-Zellen von Masernpatienten für die CD11a-exprimierenden Zellen eine prozentuale Zunahme festgestellt werden; nicht jedoch bei Impfungen.

Den regulatorischen CD4⁺/CD25⁺/CTLA-4⁺ T-Zellen werden suppressive Aktivitäten im Verlauf einer Immunreaktion zugeschrieben. Ein Vergleich der Proben von Masernpatienten in verschiedenen Infektionsstadien ergab, Anzeichen auf zunehmende Aktivität CD4⁺/CD25⁺/CTLA-4⁺ T_{reg}-Zellen.

Beim Vergleich der Akutpatienten und Impfungen bei der Produktion von Typ1 IFN im Rahmen der Immunreaktion zeigten die Ergebnisse, dass im Verlauf der Erkrankung die Mengen an Typ1 IFN allmählich abfielen, während sich nach Vakzinierung das Bild uneinheitlich darstellte.

Beim Vergleich der Proliferationsfähigkeit der α/β - und der γ/δ -T-Zellen von Masernpatienten und Impflingen zeigte sich im Verlauf der Akuterkrankung eine deutliche Reduktion, während die Ergebnisse der Impflinge weitgehend unverändert bis progredient waren.

Für die Ermittlung der Kapazität zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen wurden isolierte Monozyten restimuliert und die Produktion von IL-6 mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass die Monozyten von Impflingen im Vergleich zu Kontrollen mit einer erhöhten IL-6 Produktion reagierten. Dagegen war bei den Monozyten von Masern-Patienten die IL-6 Produktion insgesamt supprimiert.

Insgesamt zeigen die Befunde, dass eine Reihe von Parametern im Verlauf der Masernerkrankung und nach einer Vakzinierung bemerkenswert unterschiedliche Reaktionsmuster aufweisen.

7. ABKÜRZUNGEN

Ak	Antikörper
APC	antigen presenting cell
APS	Ammoniumpersulfat
CD	cluster of differentiation
CPE	zytopathischer Effekt
DC	dendritische Zelle
ED	Edmonston- Masernvakzinestamm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	flouescence activated cell sorter
FITC	Fluoresceinisocyanat
FKS	fetales Kälberserum
GITR	glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family related gene
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony stimulatory factor
HHT	Hämagglutinationshemmtest
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPP	Isopentenyl Pyrophosphat
LPS	Lipopolysaccharid
MMR	Masern-Mumps-Röteln
Mono	Monozyten
MV	Masernvirus
NK	natürliche Killerzelle
NTE	Natriumchlorid/Tris/EDTA
Pam ₃ CSK ₄	Pam ₃ CysSerLys ₄
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PC 5	PE-Cy5
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd

7. Abkürzungen

PHA	Phytohämagglutinin
RE	relative Expansion
RKI	Robert-Koch Institut
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SAC	Staphylococcus aureus-Cowan strain
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SI	Stimulationsindex
STIKO	Ständige Impfkommission
TCR	T cell receptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organization
WTF	Wildtyp Fleckenstein Masernvirus

DANKSAGUNG

Mein allererster Dank geht an Frau Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies für die Möglichkeit zur Bearbeitung dieser interessanten Thematik und für die vielfältigen Unterstützungen. Ihre ständige Diskussionsbereitschaft und vielen guten Ideen haben entscheidend zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Volker ter Meulen und Herrn Prof. Dr. Axel Rethwilm danke ich für die Unterstützung während meiner Zeit im Institut und der experimentellen Arbeiten für meine Dissertation.

Ein herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. Kreth und Herrn Dr. Ralf Nanan sowie allen Mitarbeitern der Kinderklinik für die gute Kooperation, die Bereitstellung der vielseitigen Untersuchungsmaterialien und die umfangreichen Informationen.

Ein besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, jederzeit hilfsbereit waren und für die stets sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Von ganzen Herzen möchte ich meiner Familie danken, die immer an mich geglaubt hat, für die unermüdliche Unterstützung und die unendliche Geduld.

Lebenslauf

Claudia BREER

Geburtsdatum:	27.07.78 in Osnabrück
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Schule:	1984 - 88 Grundschule in Osnabrück 1988 - 97 Paracelsus-Gymnasium Stuttgart Abitur Juni 1997 Leistungskurse: Englisch, Biologie
Studium:	WS 1997 Universität Würzburg Studienfach: Humanmedizin Physikum: 09.09.1999 1. Staatsexamen: 29.08.2000 2. Staatsexamen: 25.03.2003 3. Staatsexamen: 07.05.2004
Ärztliche Tätigkeit	Sept 2004- März 2005 Assistenzärztin für Innere Medizin, HELIOS Klinikum Aue April 2005 – April 2006 Assistenzärztin für Innere Medizin EKH Onkologisches Fachkrankenhaus Marienstift Schwarzenberg Seit Mai 2006 Assistenzärztin für Innere Medizin, KKH Stollberg
Dissertation:	Institut für Immunbiologie und Virologie bei Prof. Dr. S. Schneider-Schaulies Titel: "Untersuchung zur Populationsdynamik und Effektorfunktionen peripherer Blutzellen im Verlauf einer Masernerkrankung bzw. nach einer Masern-Vakzinierung"
Publikation:	Bieback K, Breer C, Nanan R, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S (2003) "Expansion of human γ/δ T cells in vitro is differentially regulated by the measles virus glycoproteins" J Gen Virol, 84, 1179-1188

