

Entwicklung alternativer Vakzinierungsstrategien gegen Masernvirusinfektionen im Tiermodell

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Bernd Schlereth

Bad Brückenau

Würzburg, 2000

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Herr Prof. Dr. V. ter Meulen

Gutachter: Herr Prof. Dr. W. Goebel

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, daß ich die Dissertation „Entwicklung alternativer Vakzinierungsstrategien gegen Masernvirusinfektionen im Tiermodell“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, daß diese Dissertation noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Ich versichere, daß ich außer den mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 18.04.00

(Bernd Schlereth)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. ter Meulen angefertigt.

Bei Prof. Dr. V. ter Meulen möchte ich mich für die Vergabe des äußerst spannenden Themas, die stete Unterstützung und sein Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Goebel danke ich für die Betreuung der Arbeit seitens der Fakultät für Biologie.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. S. Niewiesk für die exzellente Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung in allen Situationen bedanken.

Für das nette und humorvolle Arbeitsklima möchte ich mich ganz herzlich bei Michaela Götzelmann, Claudia Neumeister, Gerald Weidinger, Karen Püschel, Joanna Pfeuffer und Annette Schaubhut bedanken.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die angenehme Zeit, die ich im Institut für Virologie und Immunbiologie verbracht habe.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meiner Verlobten Sabine für ihre ständige Unterstützung und Aufmunterung bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	10
1.1.	Epidemiologie und Klinik der akuten Masern	10
1.2.	Struktur des Masernvirus	11
1.3.	MV-spezifische Immunantwort	12
1.3.1	Humorale MV-spezifische Immunantwort	12
1.3.2.	Zelluläre MV-spezifische Immunantwort	13
1.4.	MV-Impfstoffe	14
1.4.1.	Aktueller Impfstoff	14
1.4.2.	Impfstoffproblematik	15
1.4.3.	Probleme bei der Eradikation	17
1.4.4.	Impfstoffvarianten und alternative Impfrouten	17
1.5.	Tiermodelle für Masernvirusinfektionen	18
1.6.	Experimentelle Impfstoffe	20
1.6.1.	Experimentelle Impfstoffe in Gegenwart maternaler Antikörper	20
1.6.2.	Spaltvakzine	21
1.6.3.	DNS-Vakzine	21
1.6.4.	VSV als Immunisierungsvektor	22
1.7.	Fragestellung	24
2.	Materialien	25
2.1.	Geräte	25
2.2.	Verbrauchsmaterialien	25
2.3.	Medien, Lösungen und Puffer	26
2.4.	Zelllinien	29
2.5.	Virusstämme	30
2.6.	Plasmide	30
2.7.	Antikörper	30
2.8.	Versuchstiere	31
3.	Methoden	31
3.1.	Zellkultur	31

3.1.1.	Haltung von Hybridoma-Linien	31
3.1.2.	Haltung von Vero-Zellen	31
3.1.3.	Haltung von BHK 21 Zellen	31
3.1.4.	Haltung von primären Baumwollratten Fibroblasten (CRF)-Zellen	31
3.1.5.	Haltung von Suspensionszellen	31
3.2.	Organentnahme und Präparation von Milzzellen	32
3.3.	MV-spezifischer Proliferationstest	32
3.4.	Präparation von Plasmid-DNS	33
3.4.1.	Bestimmung der DNS-Konzentration und des Reinheitsgrades	33
3.5.	Immunhistochemie	34
3.5.1.	Reinigung von Immunglobulinen	34
3.5.1.1.	Hybridoma-Überstand	34
3.5.1.2.	Affinitätschromatographie mit Protein G	34
3.5.2.	Immunfluoreszenz	35
3.5.3.	Antikörpernachweis	35
3.5.3.1.	ELISA	35
3.5.3.1.1.	ELISA zum Nachweis MV-spez. IgG Antikörper aus der Baumwollratte	36
3.5.3.1.2.	ELISA zum Nachweis MV-spez. humaner IgG Antikörper	36
3.5.3.2.	Neutralisationstest	37
3.5.3.2.1.	Masernvirus Neutralisationstest	37
3.5.3.2.2.	MV-spez. Plaque Reduktionsneutralisationstest (PRNT)	38
3.5.3.2.3.	VSV-spez. Neutralisationstest (NT bzw. PRNT)	38
3.6.	Virologische Methoden	39
3.6.1.	Masernvirus Anzucht (MV-Ed, MV-Hu2)	39
3.6.2.	Plaquetest	39
3.6.3.	VSV-Anzucht (VSV-Indiana, VSV-H, CT 9-H, CT 1-H)	40
3.6.4.	VSV-Plaquetest	40
3.6.5.	Gewinnung von Masernvirusantigen	41
3.7.	Tierexperimentelle Methoden	42
3.7.1.	Intraperitoneale Immunisierung von Baumwollratten	42
3.7.2.	Intranasale Immunisierung von Baumwollratten	42
3.7.3.	Orale Immunisierung von Baumwollratten	42
3.7.4.	Intratracheale Immunisierung von Baumwollratten	43
3.7.5.	Intrazerebrale Immunisierung von Baumwollratten	44

3.7.6.	DNS-Immunsisierung	44
3.7.6.1.	Intramuskuläre DNS-Immunsisierung	44
3.7.6.2.	Intradermale DNS-Immunsisierung	45
3.7.7.	Blutentnahme und Serumgewinnung	45
3.7.8.	Schutzversuche und Histologie	46
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Baumwollratten als Tiermodell für die Inhibition der Vakzine-induzierten Serokonversion	47
4.1.1.	Modellsystem für natürliche maternale Antikörper	47
4.1.2.	Alternatives Modellsystem für maternale Antikörper	49
4.1.2.1.	Passiver Transfer eines Humanserums simuliert maternale MV-spezifische Antikörper	50
4.1.2.2.	Passiver Transfer von humanen MV-spezifischen Antikörpern inhibiert die Vakzine-induzierte Serokonversion	52
4.1.2.3.	Die Inhibition ist abhängig von der Konzentration an MV-spezifischen Antikörpern	54
4.1.2.4.	Immunsierungsroute, -dosis und -schema zeigen nur geringen Einfluß	56
4.2.	DNS-Vakzine	57
4.2.1.	Intramuskuläre DNS-Immunsisierung	57
4.2.2.	Intradermale DNS-Immunsisierung	58
4.2.3.	Optimierung der Immunsierungsparameter	59
4.2.4.	Vergleich der Immunogenität unterschiedlicher MV-Proteine (H, F und N)	60
4.2.5.	Histologische Untersuchung des Lungengewebes immunisierter Baumwollratten	64
4.2.6.	DNS-Immunsisierung in Gegenwart MV-spezifischer („maternaler“) Antikörper	66
4.3.	VSV als Immunsierungsvektor	68
4.3.1.	Pathogenität von VSV bzw. VSV-H im Tiermodell	68
4.3.1.1.	<i>In vivo</i> Replikation von VSV-H	69
4.3.2.	Immunogenität von VSV-H in Baumwollratten	70
4.3.2.1.	Antikörpertiter sind abhängig von der Immunsierungsdosis	71

4.3.2.2.	Direkter Vergleich zwischen VSV-H und MV	73
4.3.3.	<i>In vitro</i> wird VSV-H nicht durch MV-spezifische Antikörper neutralisiert	75
4.3.4.	VSV-H induziert MV-neutralisierende Antikörper in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper	76
4.3.4.1.	Der Immuisierungserfolg in Gegenwart maternalen Antikörper ist abhängig von der Immunisierungsdosis	78
4.3.4.2.	Replikationsfähiges VSV-H ist essentiell, um eine MV-spezifische Immunantwort zu induzieren	79
4.3.4.3.	VSV-H ist auch in Gegenwart von natürlichen maternalen Antikörpern effektiv	79
4.3.5.	Intratracheale Immunisierung mit VSV-H	81
4.3.6.	Intrazerebrale Immunisierung mit VSV-H	83
4.3.6.1.	VSV-H Deletionsmutanten CT 9-H und CT 1-H	83
4.3.6.2.	Intrazerebrale Immunisierung mit CT 9-H	85
4.3.7.	Immunogenität der Deletionsmutanten CT 9-H und CT 1-H	86
4.3.8.	Immunogenität von CT 9-H und CT 1-H in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper	88
5.	Diskussion	90
6.	Zusammenfassung	99
7.	Summary	101
8.	Literaturverzeichnis	104
9.	Abkürzungsverzeichnis	113

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und Klinik der akuten Masern

Masernviren sind weltweit verbreitet und verursachen eine schwere hochfieberhafte systemische Erkrankung. Trotz der Einführung eines attenuierten Lebendimpfstoffes, erkranken jährlich noch ca. 40 Millionen Menschen an Masern und mehr als 1 Million versterben daran. 1998 war Masern eine der zehn häufigsten und der zehn tödlichsten Infektionskrankheiten weltweit (World Health Report 1999). Es wird geschätzt, daß in Deutschland gegenwärtig jährlich noch 50.000–100.000 Masernerkrankungen auftreten. Auf etwa 10.000 Masernerkrankungen entfällt hier eine Erkrankung mit tödlichem Ausgang. Im Gegensatz dazu ist die medizinische Bedeutung der Masern in den Entwicklungsländern, besonders in Afrika, wesentlich größer. Hier sind die Masern nach wie vor die gefährlichste Infektionskrankheit im Kindesalter.

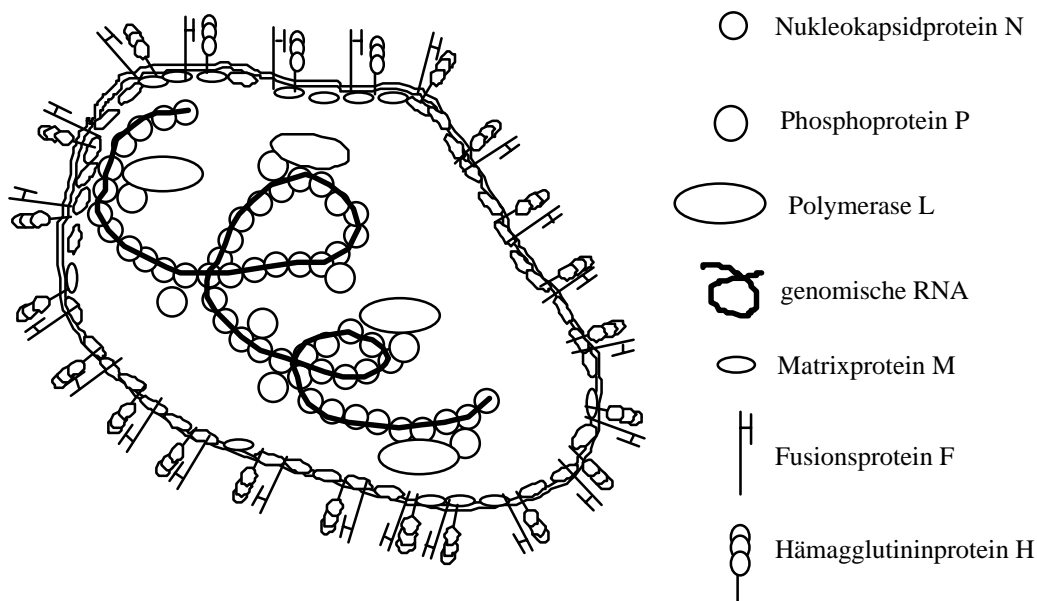
Die Übertragung erfolgt aerogen über Tröpfcheninfektion (Husten, Niesen, Sprechen). Das Masernvirus (MV) ist hoch kontagiös und löst bei 95 % der Infizierten eine Manifestation klinischer Erscheinungen aus. Die Inkubationszeit beträgt etwa 8-10 Tage. Zu den ersten Symptomen gehören Bindehautentzündung, Lichtscheue, Husten, Schnupfen und schnell ansteigendes Fieber. Etwa 2-3 Tage nach den ersten Krankheitszeichen fällt das Fieber wieder ab. Anschließend tritt gleichzeitig mit erneutem Fieberanstieg auf bis zu 40°C das charakteristische Masernexanthem auf. Die Infektiosität der Patienten erstreckt sich von 5 Tagen vor bis zu 4 Tagen nach Auftreten des Exanthems und ist unmittelbar vor Ausbruch des Exanthems am größten.

10 % aller MV-Infektionen sind in industrialisierten Ländern mit Komplikationen verbunden (Diarrhoe (2,5 %), Pneumonie (2,5 %), Mittelohrentzündung (5 %) und Enzephalitis (0,1 %)) (Clements und Cutts, 1995) (siehe Tabelle 1). In Deutschland müssen gegenwärtig jährlich noch ca. 1000–4.500 Fälle (überwiegend Kinder und Jugendliche) aufgrund von Komplikationen in einem Krankenhaus behandelt werden (Epidemiologisches Bulletin 44/1999). In Entwicklungsländern liegt die Komplikationsrate um ein Vielfaches höher und Pneumonie und Diarrhoe nehmen aufgrund der ausgeprägten MV-induzierten Immunsuppression durch virale, bakterielle und parasitäre Sekundärinfektionen oft einen tödlichen Verlauf.

1.2. Struktur des MV

MV gehört zum Genus der Morbilliviren innerhalb der Familie der Paramyxoviridae. Es ist ein membranumhülltes Virus mit einem negativsträngigen, unsegmentierten, einzelsträngigen RNA Genom. Die viralen Partikel sind von pleomorpher Gestalt mit einem Durchmesser von 300 nm bis ca. 1000 nm (Lund et al., 1984).

Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung des MV-Partikels.



Das RNA-Genom umfaßt 15894 Nucleotide und kodiert für 6 Strukturproteine: Nucleokapsidprotein (N), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Fusionsprotein (F), Hämagglutinin (H) und Polymerase (L). Das am häufigsten in infizierten Zellen vorkommende virale Protein ist das Nucleokapsidprotein (60 KD) (Rozenblatt et al., 1985). Das N Protein verpackt die genomische virale RNA (Castaneda und Wong, 1990), (Udem und Cook, 1984) und schützt das Genom vor zellulären RNAsen. Das mit dem Nucleokapsidprotein komplexierte Genom bildet zusammen mit dem Phosphoprotein ("Transaktivator") (72 KD) und der Polymerase (220 KD) (Griffin und Bellini, 1996) den Ribonucleokapsid (RNP)-Komplex. Der RNP-Komplex ist von einer Lipidhülle umgeben, an deren Innenseite das Matrixprotein (37 kD) angelagert ist. Das M Protein interagiert mit dem RNP-Komplex und mit der Hüllmembran und übernimmt eine wichtige Funktion bei der

Virus Morphogenese. In die Hüllmembran sind die beiden Glykoproteine, das Fusions (F)- und das Hämagglutinin (H)-Protein inseriert. Das F-Protein ist ein Typ I Membranglykoprotein und für die Fusion der viralen Membran mit der Wirtszellmembran verantwortlich. Das Fusionsprotein wird als ein inaktives Vorläuferprotein (F_0) synthetisiert. Durch die Spaltung des F_0 Vorläuferproteins in die Untereinheiten F_1 (41 kD) und F_2 (20kD) entsteht ein neuer hydrophober Aminoterminus (Fusionsdomäne) am F_1 Protein (Richardson et al., 1986), (Varsanyi et al., 1985). Aufgrund der hohen Hydrophobizität wird angenommen, daß dieser Teil des F Proteins während des Fusionsprozesses in die Wirtszellmembran interkaliert. Das Hämagglutininprotein (80 KD) ist ein Typ 2 Membranglykoprotein und das Rezeptor-bindende Protein des Masernvirus. Der Rezeptor für Masernvirus (Impfstamm) ist das humane CD 46 Molekül (Doerig, et al., 1993), (Schneider-Schaulies, et al., 1995). CD 46 (Komplement Membran Kofaktor Protein) ist ein klassisches Transmembranprotein, welches die Komplementfaktoren C3b und C4b bindet und die Komplement-vermittelte Lyse inhibiert (Liszewski, et al., 1991). Es gibt aber Hinweise darauf, daß Wildtyp-MV Stämme nicht CD46, sondern alternative Rezeptoren benutzen (Lecoutourier, et al., 1996), (Buckland and Wild 1997), (Bartz, et al., 1998). Nach Rezeptorbindung induziert das Hämagglutininprotein eine Konformationsänderung im Fusionsprotein, die dazu führt, daß die fusogene Region am aminoterminalen Ende des F_1 -Proteins in die Wirtszellmembran interkaliert und so die Fusion zwischen Virus und Zellmembran einleitet (Lamb, 1993), (Nussbaum, et al., 1995).

1.3. MV-spezifische Immunantwort

1.3.1. Humorale MV-spezifische Immunantwort

Mit Auftreten des Exanthems werden IgM Antikörper gegen alle Virusproteine gebildet, gefolgt von IgG Antikörpern, die höchste Antikörpertiter nach 4-6 Wochen erreichen (Cherry, 1987), (Carter und ter Meulen, 1987). Hauptantigene für die humorale Immunreaktion sind das MV-N Protein und das MV-H Protein. MV-F und MV-M spezifische Antikörper sind nur in geringer Menge vorhanden (Norrby und Gollmar, 1972). Antikörper, die gegen das Hämagglutinin und Fusionsprotein gerichtet sind, haben virusneutralisierende Aktivität (ter Meulen, et al., 1981), (Merz, et al., 1980), (Malvoisin und Wild, 1990) und können den Organismus vor einer Reinfektion schützen (Giraudon und Wild, 1985), (Norrby, et al., 1975). Die Höhe der Antikörpertiter nach Infektion bleibt auch in Abwesenheit einer Reexposition konstant hoch (Black und Rosen, 1962), (Preblud und Katz, 1988). Das Vorliegen von MV-neutralisierenden Antikörpern (nach Infektion bzw. Immunisierung) wird

als Protektionsparameter verwendet. Ein Antikörpertiter von > 120 mIU wird als protektiv angesehen, während niedrigere Titer < 120 mIU nicht vor Reinfektion schützen (Francisco et al., 1998), (Chen, et al., 1990). Klinisch wurde die protektive Eigenschaft von neutralisierenden Antikörpern für die passive Immunisierung von immunsupprimierten Patienten genutzt. Die Gabe von Hyperimmunglobulin kann bis zu 5 Tage nach der Exposition den Ausbruch der akuten Masern verhindern oder den Krankheitsverlauf modifizieren.

1.3.2. Zelluläre MV-spezifische Immunantwort

Die MV-spezifische zelluläre Immunantwort ist für die Überwindung der akuten Infektion von entscheidender Bedeutung. MV-infizierte Patienten, die an einer angeborenen Agammaglobulinämie leiden und somit nur eine zelluläre MV-spezifische Immunantwort ausbilden, können das Virus vollständig aus dem Körper eliminieren (Bruton, 1953), (Good und Zak, 1956). Patienten, die an einer T-Zell-Defizienz leiden, entwickeln schwere, meist letale Verlaufsformen der Masern (Katz, 1995).

Während der akuten Masernvirusinfektion wird die zelluläre Immunantwort aktiviert. Die Aktivierung der T-Lymphozyten manifestiert sich in einer Erhöhung des Plasmaspiegels löslicher Formen der T-Zelloberflächenmoleküle CD4, CD8, IL2-Rezeptor sowie β 2-Mikroglobulin (Griffin and Ward, 1993), (Griffin, et al., 1989, 1992). Noch vor dem Auftreten des Exanthems kommt es zur Erhöhung der Menge an IFN- γ im Plasma, gefolgt von einem Anstieg der Menge an IL-2 während des MV-Ausschlages. Mit dem Abklingen des Exanthems ist eine Zunahme der Menge an IL-4 im Plasma nachweisbar (Griffin und Ward, 1993), (Griffin, et al., 1990). Diese Zytokinexpression im Verlauf einer Masernvirusinfektion läßt darauf schließen, daß es während der akuten Phase zu einer Aktivierung von CD4⁺ Th0-Zellen und von CD8⁺ T-Zellen kommt. Nach Abklingen des Exanthems wird diese von einer lang andauernden Aktivierung von CD4⁺ Th2-Zellen abgelöst (Griffin 1995).

Im Blut von Rekonvaleszenten können sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ MV-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (Kreth, et al., 1979), (van Binnendijk, et al., 1990). CD4⁺ Th-Zellen proliferieren nach Stimulation mit internen MV-Proteinen (N, M und P) und auch nach Stimulation mit den Oberflächenglykoproteinen (H und F) (Van Binnendijk, et al., 1992), (Ilonen, et al., 1990), (Jakobsen, et al., 1989). In Masern-seropositiven Individuen können sowohl CD 4⁺ als auch CD 8⁺ zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden (Jakobsen, et al., 1989), (van Binnendijk, et al., 1989). Nach Stimulation mit UV-inaktiviertem Masernvirus können überwiegend CD 4⁺ zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden (Jakobsen, et al.,

1989), während nach Stimulation mit MV-infizierten Zellen hauptsächlich CD8⁺ zytotoxische T-Zellen nachweisbar sind (van Binnendijk, et al., 1990). Die MV-spezifische zytotoxische T-Zellantwort richtet sich hauptsächlich gegen das MV-Fusionsprotein und gegen das Hämagglutininprotein, während die Nukleokapsid-spezifische Lyse schwächer ausgeprägt ist (Jaye, et al., 1998). Mit Hilfe von Peptidstimulation konnte in MV-seropositiven Kindern eine Reihe von T-Zellepitopen für CD8⁺ zytotoxische T-Zellen definiert werden (Nanan et al. 1995).

1.4. MV-Impfstoffe

1.4.1. Aktueller Impfstoff

Bereits 1954 gelang es Enders und Peebles, Masernvirus zu isolieren und *in vitro* zu amplifizieren (Enders und Peebles, 1954). Durch ausgedehnte Zellkulturpassagen entwickelten sie 1962 den Lebendimpfstoff Edmonston B. Wegen seiner noch vorhandenen Pathogenität wurde dieses Lebendvirus oft mit Immunglobulinen koappliziert. Bis zum Ende der sechziger Jahre wurde der Masernvirusstamm Edmonston weiter attenuiert und unter den verschiedensten Bezeichnungen benutzt (Schwarz, Moraten, AIK-C, Edmonston Zagreb). Während nach natürlicher Infektion der Schutz gegen Masern lebenslang erhalten bleibt (Panum, et al., 1938), nimmt der Schutz nach einmaliger Applikation bei einer Minderzahl von Geimpften ab (zur Übersicht (Clements and Cutts, 1995)). Um eine lang andauernde Immunität zu induzieren, wird nach den Empfehlungen der WHO der Impfstoff zweimal im Alter von 12 bis 15 Monaten und zwischen 5 und 6 Jahren appliziert. Der heutige Impfstoff ist sehr immunogen und die Vakzineeffizienz liegt unter optimalen Bedingungen bei mehr als 95%. Bei bis zu 5% der Impflinge treten die sogenannten Impfmasern auf (mäßiges Fieber, flüchtiges Exanthem und milde respiratorische Symptome 2 Wochen nach der Immunisierung) (Epidemiologisches Bulletin 44/1999). Die mit dem Impfstoff verbundenen Nebenwirkungen sind aber sehr gering im Vergleich zur natürlichen Infektion (siehe Tabelle 1). Mit der Einführung eines attenuierten Lebendimpfstoffes konnte die MV-assoziierte Morbidität und Mortalität deutlich reduziert werden. Weltweit ist die Zahl der Masern-assoziierten Todesfälle von ca. 8 Millionen auf 1 Million zurückgegangen. Man schätzt das jährlich etwa 90 Millionen Masernerkrankungen durch präventive Maßnahmen vermieden werden können.

Tabelle 1. Häufigkeit des Auftretens von Komplikationen nach akuten Masern und Masernvirusimmunisierung (modifiziert nach (Duclos und Ward, 1998))

Komplikationen	Häufigkeit nach natürlicher	Häufigkeit nach
	Infektion	Impfung
Otitis media	7-9%	0
Pneumonie	1-6%	0
Diarrhoe	6%	0
Postinfektiöse Enzephalomyelitis	0,5-1 per 1000	1 per 1.000.000
SSPE	1 per 100.000	0
Anaphylaxie (vermutlich gegen hydolysiertes Gelatin)	0	1 per 100.000 bis 1 per 1.000.000
Todesfälle	0,1-1 per 1000 (5-15% in Entwicklungsländern)	0

1.4.2. Impfstoffproblematik

Besonders Kleinkinder besitzen innerhalb des ersten Lebensjahres ein hohes Risiko an Masern zu erkranken und der Anteil an schweren Krankheitsverläufen mit letalem Ausgang ist in dieser Altersgruppe sehr hoch. Aus diesem Grund wäre es sehr wichtig, Säuglinge bereits in den ersten Lebensmonaten erfolgreich zu immunisieren. Ein sehr großes Problem für Impfungen im Kleinkindalter ist die Präsenz von maternalen MV-spezifischen Antikörpern zum Zeitpunkt der Immunisierung. Foeten erhalten am Ende der Schwangerschaft über die Plazenta (Black, et al., 1986) und Säuglinge über die Muttermilch maternale MV-spezifische Antikörper. Hierbei ist die transferierte Menge an maternalen Antikörpern abhängig vom Antikörpertiter der Mutter. Kinder von Müttern, die an Masern erkrankten, haben höhere und länger nachweisbare Antikörpertiter als Kinder von immunisierten Müttern (De Serres, et al., 1997), (Markowitz, et al., 1996), (Maldonado, et al., 1995). In Abhängigkeit vom Titer an maternalen Antikörpern sind Säuglinge zunächst gegen eine Infektion mit dem Wildtypvirus geschützt. Mit abnehmendem Antikörpertiter läßt dieser Schutz nach und die Kinder werden empfänglich für MV-Infektionen. Allerdings sind auch noch geringe nicht protektive Titer an maternalen Antikörpern ausreichend, um eine erfolgreiche Immunisierung mit dem attenuierten Impfvirus zu verhindern. Daraus resultiert

eine Protektionslücke, in der die Kleinkinder nicht gegen MV geschützt sind, aber aufgrund der noch vorhandenen MV-spezifischen Antikörpern auch nicht erfolgreich immunisiert werden können.

In Abbildung 2 ist exemplarisch der maternale Antikörperverlauf bei Säuglingen von MV-immunen Müttern in der ländlichen Umgebung von Bangladesch dargestellt (Francisko, et al., 1998).

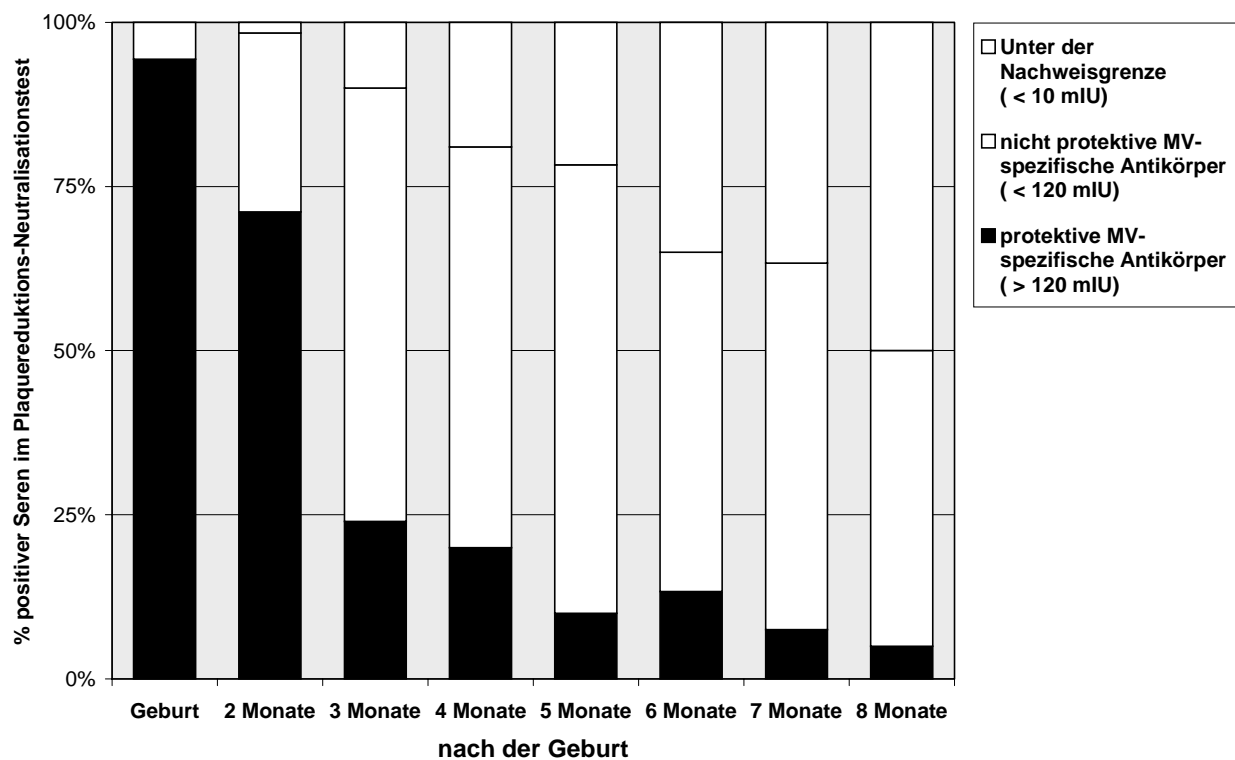


Abb.2.: Maternaler Antikörperverlauf bei 330 Säuglingen in der ländlichen Region von Bangladesch. Maternale Antikörpertiter wurden mit Hilfe eines ELISA-Systems und des Plaque-Reduktionsneutralisationstest (PRNT) bestimmt.

Der schraffierte Bereich repräsentiert die Prozentzahl der für MV-Infektion empfänglichen Kinder, die aufgrund der noch vorhandenen nicht protektiven maternalen Antikörper nicht erfolgreich immunisiert werden können. Da die Titer an maternalen Antikörpern in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen stark variieren und unterschiedlich lange nachweisbar sind, ist es schwierig, einen optimalen Immunisierungszeitpunkt zu bestimmen, der eine hohe Serokonversionsrate garantiert und gleichzeitig die Zeitspanne, in der die Kinder für MV empfänglich sind, minimiert.

1.4.3. Probleme bei der Eradikation

In den Industrienationen mit hoher Immunisierungsrate sind die akuten Masern weitgehend unter Kontrolle gebracht worden. Aber um Masern wie von der WHO gefordert, bis zum Jahre 2010 auszurotten (WHO Report on Infectious Diseases Eradication and Elimination Initiatives), wird eine alleinige Intensivierung der Impfprogramme mit dem derzeitigen Impfstoff nicht ausreichen. Die hohe Empfindlichkeit des derzeitigen Impfstoffes gegenüber äußeren Einflüssen wie erhöhte Temperatur, Licht, UV-Strahlen, Fettlösungs- und Desinfektionsmitteln erschweren besonders in den Entwicklungsländern den routinemäßigen Einsatz. Ein schwerwiegenderes Problem ist die Tatsache, daß auch in Ländern mit sehr hoher Immunisierungsrate vereinzelt Masernepidemien auftreten. Hier konnte gezeigt werden, daß auch seropositive, immunisierte Individuen mit MV-Wildtypviren infiziert werden können, ohne Manifestation klinischer Symptome (Pedersen, et al., 1989), (Edmonson, et al., 1990). Die Persistenz wildtypischer Masernviren in immunen Populationen und häufiges Impfstoffversagen in den ersten 12 Monaten nach der Geburt erschweren eine globale Eradikation der Masern. Aus diesem Grund hat die WHO dazu aufgerufen neuartige Impfstoffe zu entwickeln, die effektiver und zudem auch in Gegenwart maternaler Antikörper anwendbar sind.

1.4.4. Impfstoffvarianten und alternative Impfrouten

Einer der ersten Versuche, eine Alternative zum Lebendimpfstoff zu entwickeln, waren Immunisierungen mit einem Tween/Ether- oder Formalin-inaktivierten Masernvirus in den 60er Jahren. Dieser Impfstoff wurde dreimal im 4-Wochenabstand verabreicht. Die induzierte Immunität war relativ kurzlebig und außerdem entwickelte eine kleine Zahl von Immunisierten atypische Masern, d. h. daß sie nach Infektion mit Wildtypvirus besonders schwer verlaufende akute Masern entwickelten (zur Übersicht (Griffin, 1995)). Klinisch konnte ein hohes, lang anhaltendes Fieber, ein besonders starkes, an den Extremitäten beginnendes Exanthem und eine Pneumonie beobachtet werden. Die Pathogenese der atypischen Masern ist ungeklärt. Bisherige Untersuchungen zeigen, daß die Inaktivierung von Masernvirus mit einer Zerstörung des Fusionsproteins einhergeht. Deshalb werden nach einer Immunisierung nur neutralisierende Antikörper gegen das Hämagglutininprotein gebildet. Da das Virus inaktiviert ist, entwickeln sich keine CD8⁺ T-Zellen, die möglicherweise wichtig für die Überwindung der Infektion sind. Außerdem zeigten Hautbiopsien des Exanthems eosinophile Granulozyten, was als Hinweis auf eine präferentielle T-Helferantwort des Typs 2 gewertet wurde (zur Übersicht (Griffin, 1995)). Als Konsequenz aus diesen Untersuchungen

wird gefordert, daß ein neuer Impfstoff die beiden Masernvirusglykoproteine, das Fusions- und das Hämagglutininprotein enthalten soll.

Ein anderer Ansatz, der die Effektivität des derzeitigen Impfstoffes in Gegenwart maternaler Antikörper verbessern sollte, war die Erhöhung der Immunisierungsdosis. Eine Immunisierung mit einer zehnfach erhöhten Impfdosis ($> 10^{4,7}$ pfu) führte bei 4 bis 6 Monate alten Kindern zu einer erhöhten Serokonversionsrate in Gegenwart maternaler Antikörper und zu Schutz gegen Infektion mit dem Wildtypvirus (Whittle, et al., 1988), (Aaby, et al., 1988). Allerdings traten häufig bei Mädchen tödlich verlaufende Infektionskrankheiten auf. Offensichtlich führte die hohe Impfdosis zu einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber (Sekundär)Infektionen und aus diesem Grund wurde diese Form der Immunisierung wieder aufgegeben (Aaby, et al., 1993), (Halsey, et al., 1993).

Da Masernvirus über die respiratorischen Schleimhäute in den Körper eintritt, wurde alternativ versucht, den Impfstoff als Aerosol zu applizieren. Entsprechende Versuche waren erfolgreich (zur Übersicht (Clements, 1995)). Allerdings ist diese Verabreichungsform technisch schwieriger, eine Übertragung von Krankheiten durch die Atemmasken ist problematisch und maternale Antikörper inhibieren auch diese Form der Immunisierung (Clements, 1995).

1.5. Tiermodelle für Masernvirusinfektionen

Da Masernvirusinfektionen (gerade in ihren schweren Verlaufsformen) vorwiegend bei kleinen Kindern auftreten, ist es nicht möglich, klinische Studien in größerem Umfang am Patienten vorzunehmen. Deshalb ist es für die Entwicklung von alternativen Masernvakzinen wichtig, potentielle Impfstoffkandidaten im Tiermodell zu testen. Für *in vivo* Untersuchungen von alternativen MV-Impfstoffen sind Affen ein geeignetes Tiermodell, weil sie nach Masernvirusinfektion eine dem Menschen ähnliche Erkrankung entwickeln (van Binnendijk, et al., 1994), (Kobune, et al., 1996). Zudem gelang es kürzlich, auch das klinische Bild der atypischen Masern im Affenmodell zu induzieren (Polack, et al., 1999). Der Einsatz von Affen ist für die Masernvirusforschung allerdings durch die hohen Kosten, das Fehlen von Inzuchttieren, ein geringes Angebot an Tieren bei hoher Nachfrage (John Cohen, 2000) sowie aus ethischen Gründen beschränkt.

In Nagetieren wie Hamster (Burnstein, et al., 1963), Maus (Griffin, et al., 1974) oder Ratte (Liebert and ter Meulen, 1987) kann nur nach intrazerebraler Inokulation mit einem neurotrophen, an Nagetiere adaptierten Masernvirus eine Enzephalitis induziert werden. Alle anderen Applikationsarten führen nicht zu einer MV-Replikation. Da in diesen

Nagetiermodellen eine intranasale Infektion nicht zur Virusreplikation in der Lunge führt, sind sie kein geeignetes Tiermodell für die Entwicklung alternativer MV-Impfstoffe.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Nagetiermodellen lassen sich Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) intranasal mit Masernvirus (sowohl mit dem MV-Impfstamm als auch mit MV-Wildtypstämmen) infizieren (Wyde, et al., 1999). Nach intranasaler Infektion repliziert das Masernvirus mit höchsten Titern an Tag 4 und 5 bis zu 10 Tage im Lungengewebe von Baumwollratten (Niewiesk, et al., 1997) (Abb.3). Histologisch ist eine bronchus-assoziierte, interstitielle Pneumonie mit nekrotischen Läsionen nachzuweisen. Die histologischen Veränderungen sind auf Tag 6 und 8 nach Infektion am ausgeprägtesten und es kommt zu einer *Restitutio ad integrum*. Die Ausheilung des Lungengewebes korreliert mit einer Abnahme des Virustiters und einem Anstieg an MV-neutralisierenden Antikörpern (Niewiesk und Germann, 2000). Im ELISA sind Masernvirus-spezifische IgG Antikörper ab Tag 8 nach Infektion nachweisbar, während neutralisierende Antikörper erst ab Tag 12 auftreten. Eine MV-spezifische T-Zellantwort ist bereits an Tag 5 nach Infektion nachweisbar und erreicht an Tag 7 und 8 ihren Höhepunkt (Abb.3). Da Baumwollratten nach MV-Infektion eine dem Menschen in vielerlei Hinsicht ähnliche Immunantwort entwickeln und nach Immunisierung mit MV-Impfstämmen wie der Mensch gegen Infektionen mit MV-Wildtypstämmen geschützt sind (Wyde, et al., 1999), sind Baumwollratten sehr gut für die Erprobung von neuartigen MV-Impfstoffen geeignet.

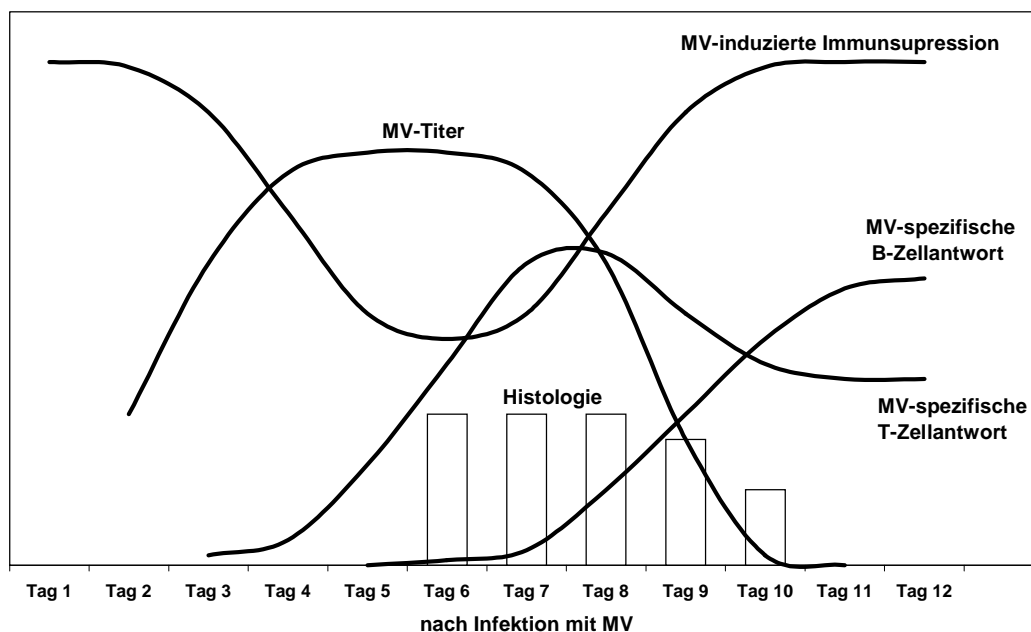


Abb.3.: Verlauf einer MV-spezifischen Immunantwort in Baumwollratten nach Infektion mit MV (nach Niewiesk und Germann, 2000)

1.6. Experimentelle Impfstoffe

Beim Menschen sind das MV-Hämagglutinin, -Fusions- und Nukleokapsidprotein die immunogensten Proteine des Masernvirus (Griffin, 1995). Bei der Entwicklung von experimentellen Impfstoffen kann man entweder die Masernvirusproteine F, H und N einzeln von einem (attenuierten) Träger exprimieren lassen oder eine Spaltvakzine herstellen, die mehrere MV-Proteine enthält.

1.6.1. Experimentelle Impfstoffe in Gegenwart maternaler Antikörper

Da die Glykoproteine (H und F) die Hauptantigene für neutralisierende Antikörper sind, wurde an Affen ISCOMs (immuno stimulating complex, eine Art Liposomen auf Quallenbasis) ausprobiert, die aufgereinigtes Hämagglutinin- und Fusionsprotein enthielten. Um die Effektivität dieser ISCOMs in Gegenwart maternaler Antikörper zu untersuchen wurde von Robert van Binnendijk ein Modellsystem für maternale Antikörper entwickelt (van Binnendijk, et al., 1995). Durch die Übertragung von Affenserum, das Masernvirus-spezifische Antikörper enthielt, auf naive Affen wurden diese gegen eine Masernvirusinfektion geschützt. Selbst nicht protektive Antikörperspiegel interferierten noch mit einer Immunisierung. In diesem Tiermodell konnte durch mehrfache Applikation von Masernvirusimpfviren als auch von ISCOMs in der Gegenwart von passiv übertragenen Antikörpern eine MV-spezifische T-Zellantwort, aber keine neutralisierenden Antikörper induziert werden. Dennoch waren die Affen gegen eine Infektion mit Masernvirus geschützt. Gegen eine Immunisierung mit ISCOMs spricht jedoch, daß ein alternativer Impfstoff bereits nach einer einmaligen Immunisierung neutralisierende Antikörper induzieren sollte, um den Menschen vor Reinfektionen zu schützen.

Auch in der Maus wurde ein Modellsystem für maternale Antikörper entwickelt. Hier wurden einerseits Jungtiere von MV-immunen Weibchen untersucht, bzw. durch Injektion eines homologen MV-spezifischen Serums in Mäuse maternale Antikörper simuliert. In diesen Mäusen wurde die Effektivität des MV-Impfstoffes und eines rekombinanten Vogelpockenvirus, welches das MV-Hämagglutinin exprimierte, in Gegenwart maternaler Antikörper untersucht (Siegrist, et al., 1998). In diesem Modell konnte nur die Immunogenität untersucht werden und es wurde gezeigt, daß sowohl eine Immunisierung mit dem MV-Impfstoff als auch mit dem rekombinanten Pockenvirus in Gegenwart maternaler Antikörper inhibiert wird. Interessant war die Beobachtung, daß die MV-spezifische T-Zellantwort durch maternale Antikörper nicht beeinträchtigt wurde.

1.6.2. Spaltvakzine

Immunisierungsstudien im Enzephalitismodell der Ratte mit rekombinanten Vakzinia Viren, welche das Nukleokapsid-, das Hämagglutinin- und das Fusionsprotein exprimierten, haben gezeigt, daß diese Antigene eine protektive Immunität gegen eine ZNS Infektion induzieren können (Bankamp, et al., 1991), (Brinckmann, et al., 1991). Im Maus-Enzephalitismodell wurde als attenuierter Träger für das Nukleokapsidprotein das Mykobakterium tuberculosis (BCG) eingesetzt (Fennelly, et al., 1995). Die damit immunisierten Mäuse waren weitgehend gegen eine Enzephalitis geschützt. Im Affenmodell dagegen entwickelten immunisierte Tiere ebenso wie nicht Immunisierte akute Masern (Zhu, et al., 1997). Hier liegt ein deutlicher Unterschied in der protektiven Immunantwort gegen die Infektion des ZNS im Vergleich zu Lunge/Gesamtorganismus vor. In der Baumwollratte wurden die MV-Glykoproteine (das Fusionsprotein und das Hämagglutinin) separat über rekombinante Adenoviren als Impfvektoren exprimiert (Fooks, et al., 1998). Die Immunisierung mit rekombinanten Adenoviren führte allerdings nur zu einem geringgradigen Schutz in Baumwollratten.

1.6.3. DNS-Vakzine

Eine neuartige und sehr interessante Möglichkeit gegen virale Infektionen zu impfen, ist die sogenannte DNS-Immunisierung (zur Übersicht (Koprowski, et al., 1998)). Da Plasmide das Immunisierungsantigen in ähnlicher Weise exprimieren, wie nach einer viralen Infektion, aber sich in eukaryontischen Zellen nicht vermehren können, sind sie eine sehr schonende und sichere Art der Immunisierung. Für die Immunisierung werden Plasmide, die unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promoters z. B. ein Gen für ein Virusprotein exprimieren, intrakutan oder intramuskulär appliziert. Entscheidend ist, daß diese Plasmide von dendritischen Zellen aufgenommen werden (Akbari, et al., 1999). In diesen wird das exprimierte Protein prozessiert und sowohl T-Zell- wie auch B-Zellantworten initiiert. Wichtig sind in diesem Zusammenhang immunstimulatorische Nukleotidsequenzen auf der DNS, die antigenpräsentierende Zellen aktivieren und eine T-Helferantwort des Type 1 fördern (zur Übersicht (Krieg, et al., 1998)). Diese Eigenschaft einer DNS-Vakzine ist um so wichtiger bei der Immunisierung von Neonaten, deren Immunsystem noch nicht ausgereift ist. In experimentellen Systemen konnte gezeigt werden, daß eine genetische Immunisierung bei Neonaten die Induktion einer T-Helferantwort des Type 1 fördert, während Proteinimmunisierungen bzw. rekombinante Vogelpockenviren eine T-Helferantwort des Typ 2 induzierten (Millan, et al., 1998), (Martinez, et al., 1997). Ein weiterer Vorteil einer DNS-Vakzine, im Hinblick auf eine Immunisierung in Gegenwart maternaler Antikörper, ist, daß

der Immunisierungsvektor (Plasmid-DNS) nicht von maternalen Antikörpern erkannt und neutralisiert werden kann. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, daß eine Plasmidimmunisierung in der Lage ist in Gegenwart maternaler Antikörper eine protektive Immunantwort zu induzieren (Hasset, et al., 1997), (Wang, et al., 1998).

Die Möglichkeit einer DNS-Vakzinierung wurde für die Masernvirusimpfung bisher nur in Mäusen und Kaninchen getestet (Cardoso, et al., 1998), (Fooks, et al., 1996), (Yang, et al., 1997). Dabei wurde festgestellt, daß das Nukleokapsid-, das Fusions- und das Hämagglutininprotein über Plasmide *in vivo* exprimiert werden und immunogen sind. Interessant war die Beobachtung, daß das MV-Hämagglutininprotein eine T-Helferantwort des Typs 2 induzierte (Cardoso, et al., 1998). Im Gegensatz dazu wurde berichtet, daß eine DNS Immunisierung neonataler Mäuse mit einem Plasmid, welches das MV-Hämagglutininprotein exprimiert, eine T-Helferantwort des Typs 1 induzierte (Martinez, et al., 1997). Eine Weiterentwicklung der DNA-Immunisierung stellt der Bakterien-vermittelte Plasmidtransfer dar (Sizemore, et al., 1995), (Dietrich, et al., 1998). Dabei wird ein eukaryontisches Plasmid in Antigen-präsentierenden Zellen über einen bisher unbekanntem Mechanismus freigesetzt. Mit Hilfe von attenuierten *Sigella flexneri* und *Salmonella typhi* konnten Masernvirusproteine exprimierende Plasmide in Mäusen zur Expression gebracht werden und waren immunogen (Fennelly, et al., 1999).

1.6.4. VSV als Immunisierungsvektor

Ein neuartiger Immunisierungsvektor ist das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV). Eine Infektion mit VSV induziert neben einer starken T-Zellantwort sehr hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern, die gegen das VSV-G (Glykoprotein) in der Hülle von VSV gerichtet sind (Zinkernagel, et al., 1978). VSV ist somit als Immunisierungsvektor für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern sehr gut geeignet. VSV ist ein umhülltes, negativsträngiges RNS Virus mit charakteristischer gewerkugelförmiger Struktur. Die streng geordnete und hochrepetitive Anordnung des VSV-G Proteins in der außergewöhnlich starren Hülle von VSV wird für die starke Immunogenität des VSV-G Proteins verantwortlich gemacht (Bachmann, et al., 1996). Nachdem es möglich war rekombinante Proteine zusätzlich zum VSV-G Protein in der Hülle von VSV zu exprimieren (Lawson, et al., 1995), wurde die Effektivität von rekombinanten Viren als Impfstoff-Vektoren untersucht. Es konnte bereits gezeigt werden, daß ein rekombinantes VSV, welches ein Hämagglutinin von Influenza A Virus in der Hülle von VSV exprimiert, hohe Titer an Influenza neutralisierenden Antikörpern induziert (Roberts, et al., 1998).

Um hohe Titer an MV-neutralisierenden Antikörpern zu induzieren wurde ein rekombinantes Vesikuläres Stomatitis Virus hergestellt, welches das Hämagglutinin von Masernvirus (Hauptantigen für neutralisierende Antikörper) exprimiert (VSV-H) (Schnell, et al., 1996) (Abb. 4).

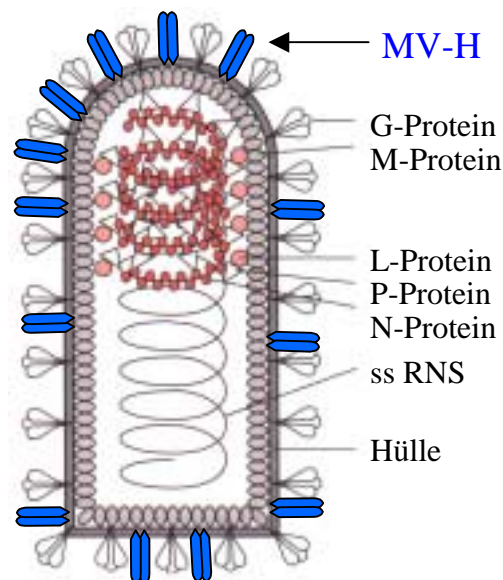


Abb. 4.: Schematische Darstellung eines rekombinanten Vesikulären Stomatitis Virus, welches das MV-Hämagglutinin exprimiert (VSV-H)

Das MV-Hämagglutinin ist zusätzlich zum VSV-Glykoprotein in die Hüllmembran von VSV inseriert, besitzt aber keine Funktion bei der viralen Replikation bzw. bei der Virusreifung. VSV-H ist genetisch stabil und die Expression des MV-H Proteins ist hoch. In infizierten Zellen wird das MV-H Protein zu 61 % der Menge des VSV-G Proteins synthetisiert. In der Virushülle von VSV-H nimmt das MV-H Protein 25 % der Oberflächenglykoproteine ein (Schnell, et al., 1996). In der Zellkultur unterscheidet sich VSV-H in der Replikationsgeschwindigkeit und im Virustiter nicht gegenüber einem VSV-Wildtyp.

Die Virulenz von VSV kann im Tiermodell durch gezielte Mutation in der Sequenz, die für den zytoplasmatischen Anteil des VSV-Glykoproteins kodiert, abgeschwächt werden. Der zytoplasmatische Anteil des VSV-Glykoproteins ist an der Virusreifung und Virusfreisetzung beteiligt. Ein Verkürzen führt zu ineffizienter Virusfreisetzung und zu verlangsamter Replikationsgeschwindigkeit. Um die Virulenz von VSV zu vermindern, wurden zwei VSV

Deletionsmutanten (CT 9 und CT 1) hergestellt, bei denen der zytoplasmatische Anteil des VSV-G Proteins von 29 Aminosäuren (AS) auf 9 AS (CT 9) bzw. auf 1 AS (CT 1) verkürzt wurde (Schnell, et al., 1998). *In vitro* konnte gezeigt werden, daß diese Mutanten eine verringerte Replikationsgeschwindigkeit und eine reduzierte Plaquegröße besitzen. Der maximale Virustiter ist bei CT 9 um den Faktor 3 und bei CT 1 um den Faktor 30 reduziert, verglichen mit dem VSV Wildtyp (Schnell, et al., 1998). Im Mausmodell wurde bestätigt, daß diese Mutanten auch *in vivo* eine verringerte Virulenz aufweisen (Roberts, et al., 1998). Für den Einsatz als MV-Immunisierungsvektoren wurden auf Basis der attenuierten Deletionsmutanten (CT 9 und CT 1) rekombinante VSV-Mutanten hergestellt, die das MV-Hämagglutinin exprimieren (CT 9-H und CT 1-H) (J. Rose, nicht veröffentlicht).

1.7. Fragestellung

Ziel dieser Dissertation war es, ein Tiermodell für maternale Antikörper zu entwickeln, in dem die Immunogenität und das protektive Potential neuartiger MV-Impfstoffe in Gegenwart maternaler MV-spezifischer Antikörper untersucht werden kann.

Da Baumwollratten ein wissenschaftlich sehr interessantes Modellsystem für Masernvirusinfektionen sind, sollte mit Baumwollratten ein Tiermodell für maternale Antikörper aufgebaut werden. Nachkommen von MV-immunen Weibchen (mit maternalen Antikörpern) sollten als Modellsystem für natürliche maternale Antikörper verwendet werden. Zusätzlich zu diesem System sollte mit dem Transfer eines MV-spezifischen Humanserums in Baumwollratten ein alternatives Modell für maternale Antikörper entwickelt werden.

Mit Hilfe der DNS-Immunisierung sollte in der Baumwollratte sowohl die Immunogenität als auch das protektive Potential der MV-Hauptantigene (Hämagglutinin-, Fusions- und Nukleokapsidprotein) miteinander verglichen und ihre Effektivität in Gegenwart maternaler Antikörper überprüft werden.

Da das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) ein sehr effektiver Immunisierungsvektor für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern ist, sollte ein rekombinantes Vesikuläres Stomatitis Virus, welches das MV-Hämagglutinin (Hauptantigen für MV-neutralisierende Antikörper) in großer Menge in der Hülle von VSV exprimiert (VSV-H), in Baumwollratten untersucht werden. Dieses rekombinante Virus sollte in seiner Effektivität und Kinetik, eine MV-spezifische Immunantwort zu induzieren, mit dem derzeitigen MV-Impfstoff verglichen und seine Effektivität in Gegenwart maternaler Antikörper untersucht werden.

2. Materialien

2.1. Geräte

- Autoklaven, MM München
- Bakterienschüttler, Certomat, Braun
- Brutschrank, Heraeus
- Durchflußzytometer (FACScan), Becton & Dickinson
- Eismaschine, Scotsman AF 10
- Elektrophoreseapparatur und Zubehör, institutseigene Werkstatt
- ELISA-Reader, BioRad
- Ethernarkosegefäß
- Fluoreszenzmikroskop mit Kameraaufsatz (Leica)
- Gelrockner, Bio-Rad
- Harvester Automach 2000, Dynatech
- Heizblock, Liebisch
- Laborwaage, Sartorius
- Magnetrührer, GLW
- Mikroskop, Leitz
- Mikrowelle, Brother Powerwave
- Netzgerät E554, Consort
- PCR Gerät, Peltier Thermal Cycler PTC-200
- Peristaltische Pumpe P-3, Pharmacia
- pH-Meter, WTW
- Pipetten, Gilson
- Rotator, Heidolph
- Rotoren SS34, JA20, GS3 (Sorvall, Beckmann)
- Spektralphotometer Ultrospec plus, LKB
- sterile Arbeitsbank, Gelaire, Flow Laboratories
- Szintillationszähler, Beckmann
- UV-Detektor, Vilber Lourmat
- Videoprint-Anlage, Mitsubishi Video Copy Processor
- Wasserbad, GFL
- Zentrifugen: Eppendorf 5417C, Hettich Rotanta/K, Sorvall RC 5B, Rotor HB-4, GSA, GS-3

2.2. Verbrauchsmaterialien

Die Chemikalien wurden von den Firmen BioRad, Böhringer, Gibco, Merk, Pharmacia, Perkin Elmer, Promega, Roth, Serva und Sigma bestellt.

Die Antikörper wurden von den Firmen, Dabko, Dianova, Hölzel Diagnostika, Pharmingen und Virion System bezogen.

Radioaktiv markierte Substanzen stammten von den Firma Amersham.

Steriles Einwegmaterial wurde von den Firmen Eppendorf, Falcon und Greiner geliefert. Glaswaren und Operationsbesteck wurde von der Firma Hartenstein geliefert.

2.3. Medien, Lösungen und Puffer

2.3.1. Zellkultur

Medien für Suspensionszellen

RPMI komplett: 500 ml RPMI 1640
2 mM/l Glutamin
1 % (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren
1 % (v/v) Na-Pyruvat
100 I.E./ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

Medien für Hybridoma-Linien

DMEM komplett: 500 ml DMEM
5% FKS
2mM/l Glutamin
1% Nicht-essentielle Aminosäuren
1% (v/v) Na-Pyruvat
100 I.E./ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
0,001 M β-Mercaptoethanol

Medien für adhärente Zellen:

MEM komplett: 500 ml MEM
100 I.E./ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
5 bzw. 10 % FKS

Medien für CRF-Zellen

DMEM komplett: 500 ml DMEM
15% FKS
4mM/l Glutamin
1% Nicht-essentielle Aminosäuren
1% (v/v) Na-Pyruvat
100 I.E./ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

Medium für die Viruszucht auf Vero-Zellen:

500 ml DMEM
2 mM/l Glutamin
1 % (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren
1 % (v/v) Na-Pyruvat
100 I.E./ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
2 % FKS

ATV: 0,8 % (w/v) NaCl
0,04 % (w/v) KCl
0,1 % (w/v) D-Glukose
0,058 % (w/v) NaHCO₃
0,05 % (w/v) Trypsin
0,02 % (w/v) EDTA

Einfriermedium: 90 % FKS
10 % DMSO

Waschmedium: PBS
0,1 % FKS

10 x PBS:
(Phosphate buffered saline) 80,0 g NaCl,
2,0 g KCl
11,5 g Na₂HPO₄ x 2H₂O
2,0 g KH₂PO₄
H₂O ad 1000 ml.

2.3.2. Bakterienkultur

LB-Medium: 20,0 g LB
5,0 g NaCl
H₂O ad 1000 ml

Bei Selektion auf Ampicillin-Resistenz: Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin.

LB-Agar: 20,0 g LB
5,0 g NaCl
15,0 g Agar
H₂O ad 1000 ml

Transformationspuffer TSS: 5 % (v/v) DMSO
50 mM MgCl₂
10 % (w/v) PEG 6000
LB-Medium ad 100 ml

2.3.3. DNA-Isolierung Lösungen des Qiagen Kit:

Puffer P1:
(Resuspensions-Puffer) 50 mM Tris-Cl pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A

Puffer P2 (Lyse-Puffer): 200 mM NaOH
1 % SDS

Puffer P3:
(Neutralisations-Puffer) 3,0 M Kaliumacetat pH 5,5

Puffer QBT: (Äquilibrium-Puffer)	750 mM NaCl 50 mM MOPS pH 7,0 15 % Isopropanol 0,15 % Triton X 100
Puffer QC (Wasch-Puffer):	1,0 M NaCl 50 mM MOPS pH 7,0 15 % Isopropanol
Puffer QF (Elutions-Puffer):	1,25 M NaCl 50 mM Tris, Tris-Cl pH 8,5 15 % Isopropanol

2.3.4. Affinitätschromatographie

Protein G Sepharose (4 Fast Flow, Firma Pharmacia)

Bindungspuffer:	20 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Elutionspuffer:	0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7
Desinfektionspuffer:	PBS/0,3 % NaN ₃
Neutralisationspuffer:	1M Tris-HCl, pH 8,6

2.3.5. Immunfärbung (Mikroskopie und Durchflußzytometrie)

Waschlösung:	PBS 1 % BSA 0,02 % NaN ₃
Antikörper Verdünnungs- Puffer:	PBS 10 % BSA 0,02 % NaN ₃
Fixierungslösung:	3,7 % Formaldehyd
Permeabilisierungslösung:	0,25 % Triton X 100 in PBS
Eindeckmedium:	9 Teile Glycerin 1 Teil PBS 2,5 % DABCO (1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan)

2.3.6. ELISA

Adsorptionspuffer:	200 mM Na-Carbonatpuffer pH = 9,6
Blockierungspuffer und	PBS

Verdünnungspuffer:	10% FKS 0,05 % Tween 20
Waschpuffer:	PBS 0,05% Tween 20
Substratpuffer:	35 mM Zitronensäure x H ₂ O 66 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, pH = 5,2
Substratlösung:	0,5 mg/ml o-Phenyldiamin in Substratpuffer 0,01% H ₂ O ₂

2.3.7. Viruszucht

MEM-Agar:	25% MEM 5% FKS 37,5% Doppel-MEM 37,5% Agarose 2%
Neutralrot-Stocklösung Gebrauchslösung:	0,017% Neutralrot Stock 1:100 in PBS verdünnt
Kristallviolettlösung:	0,05 % Kristallviolett 20 % Ethanol

2.3.8. Virusreinigung

NTE-Puffer:	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA, PH = 7,4
NTE-Sucrose:	25% Sucrose, 25g (w/w) in NTE-Puffer verdünnt 30% Sucrose, 30g (w/w) in NTE-Puffer verdünnt 50% Sucrose, 50g (w/w) in NTE-Puffer verdünnt 60% Sucrose, 60g (w/w) in NTE-Puffer verdünnt

2.4. Zelllinien

Vero-Zellen:	aus Nierenzellen grüner Meerkatzen gewonnene Zelllinie, für die Zucht von Masernvirus
BHK 21-Zellen:	aus Nierenzellen von Zwerghamstern gewonnene Zelllinie, für die Zucht von VSV
CTLL (Klon 3):	Interleukin-2 abhängige T-Lymphoblasten, zum Nachweis von IL-2 in T-Zellkulturüberständen
CRF-Zellen	primäre Baumwollratten Fibroblasten-Zelllinie

2.5. Virusstämme

Virus-Stämme	Herkunft	Bemerkung
MV-Edmonston	Virologie, Würzburg	Laborstamm
MV-Hu2	Rima, et al., 1993	Enzephalitis-Isolat
VSV-Indiana	Virologie, Würzburg	VSV-Wildtyp
VSV-H	Schnell, et al., 1996	exprimiert MV-H
CT 9-H	Schnell, et al., 1998	VSV-H Deletionsmutante
CT 1-H	Schnell, et al., 1998	VSV-H Deletionsmutante

2.6. Plasmide

Plasmid	Herkunft	Bemerkung
pCGF ₁	Schlender, et al., 1996	exprimiert MV-F
pCGH ₅	Schlender, et al., 1996	exprimiert MV-H
pSC-N	Huber, et al., 1991	exprimiert MV-N
pCDNA3	Invitrogen	Stimulator-DNS

2.7. Antikörper

Antikörper	Herkunft	Spezifität
Humanes anti-MV-Serum	Virologie, Würzburg	MV-F, MV-H und MV-N
Kaninchen-anti-CR-IgG	Virion Systems, Rockville, USA	Baumwollratten IgG-Antikörper
Maus-anti-CR-IgA	Virion Systems, Rockville, USA	Baumwollratten IgA-Antikörper
Kaninchen-anti-human IgG	Dako, Dänemark	humane IgG-Antikörper
HRP-Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Zymed. San Francisco, USA	Kaninchen IgG-Antikörper
HRP-Esel-anti-Maus-IgG	Dianova, Hamburg	Maus-IgG-Antikörper
FITC-anti-Maus	Zymed. San Francisco, USA	Maus IgG-Antikörper
Maus monoklonaler Antikörper A504	Virologie, Würzburg	MV-Fusionsprotein
Maus monoklonaler Antikörper L77	Virologie, Würzburg	MV-Hämagglutinin
Maus monoklonaler Antikörper F227	Virologie, Würzburg	MV-Nukleokapsid

2.8. Versuchstiere

Der Baumwollratteninzuchtstamm Cotton/Nico wurde von der Firma Iffa Credo (Lyon, Frankreich). Die Tiere wurden unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen bei einer Raumtemperatur von $21 \pm 2^\circ\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5 \%$ und einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden innerhalb eines Barriersystems gehalten. Frühestens 1 Woche nach Anlieferung wurden die Tiere im Versuch eingesetzt. Für tierexperimentelle Versuche wurden zum Teil auch Baumwollratten aus der eigenen Zucht verwendet.

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Haltung von Hybridoma-Linien

Hybridoma-Linien wurden in DMEM komplett/5% FKS kultiviert und in Abständen von 3 bis 4 Tagen 1:10 geteilt.

3.1.2. Haltung von Vero-Zellen

Vero- und L-Zellen wurden in MEM/5% FKS kultiviert, zweimal pro Woche mit 10 ml ATV von der Kulturflasche abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und 1:5 verdünnt wieder in Zellkulturflaschen ausgesät.

3.1.3. Haltung von BHK 21 Zellen

BHK 21 Zellen wurden in MEM/10 % FKS kultiviert und zweimal pro Woche mit 10 ml ATV von der Kulturflasche abgelöst und 1:10 verdünnt wieder ausgesät.

3.1.4. Haltung von primären Baumwollratten Fibroblasten (CRF)-Zellen

Primäre CRF-Zellen wurden in DMEM/15 % FKS + Glutamin kultiviert und einmal pro Woche mit 10 ml ATV von der Kulturflasche abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und 1:5 bzw. 1:3 (abhängig vom Wachstum) verdünnt wieder in Flaschen ausgesät.

3.1.5. Haltung von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden in RPMI komplett/10% FKS kultiviert und in Abständen von 3 bis 4 Tagen 1:10 geteilt.

3.2. Organentnahme und Präparation von Milzzellen

Baumwollratten wurden durch die Inhalation von CO₂ mit Hilfe von Trockeneis getötet, die Peritonealhöhle steril eröffnet und nach Instrumentenwechsel die Milz entnommen. Mit sterilen Pinzetten wurde die Milz von anhaftendem Gewebe befreit, in 2 Hälften geteilt und die Zellen durch ein Stahlsieb gestrichen. Milzreste wurden mit Hilfe eines Spritzenkolbens durch das Sieb passiert. Die Milzzellen wurden dreimal in einem Volumen von 40 ml PBS 0,1 % FKS gewaschen und anschließend gezählt. Hierauf wurden die Zellen in einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro ml in RPMI-10 % FKS Kulturmedium resuspendiert und für den Proliferationstest eingesetzt.

3.3. MV spezifischer Proliferationstest

Um die MV-spezifische T-Zellproliferation nach Immunisierung mit MV, VSV-H und DNS-Immunisierung zu messen, wurden Milzzellen immunisierter Tiere im Proliferationstest untersucht. Das Prinzip des Proliferationstestes beruht darauf, die intrazelluläre Stoffwechselaktivität, durch den Einbau von radioaktiv markierten Vorläufersubstanzen bei der DNA-Synthese, zu bestimmen. Für die Messung der MV-spezifischen Proliferation *ex vivo* wurden 5×10^5 Milzzellen in einer 96-Napf-Mikrotiterplatte mit Flachboden ausgesät und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Stimulation der MV-spezifischen Proliferation wurde die Zellkulturplatte am Vortag mit 100 µl gereinigtem MV-Antigen (10µg/ml in 200 mM NaCO₃) beschichtet. Als Positivkontrolle wurden Milzzellen mit ConA (2,5µg/ml) und als Negativkontrolle Milzzellen nur mit Medium stimuliert. Von allen Ansätzen wurden jeweils Dreifachbestimmungen ausgeführt. Nach 48h Inkubation wurde 0,5 µCi Methyl-3H-Thymidin (3HdT) in einem Volumen von 25 µl/Napf zugegeben. 18 Stunden später wurden die Zellen geerntet, indem der Inhalt der Nöpfe mit einem Zell-Erntegerät auf einen Glasfaserfilter gesaugt wurde. Dabei verblieb das in die DNS eingebaute 3HdT im Filter, die freie Radioaktivität wurde gewaschen. Die Filtermatte wurde in eine mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllte Folie eingeschweißt und am β-Szintillationszähler (β-plate) der Thymidineinbau in Zerfällen pro Minute (c.p.m.) als Maß für die Proliferation der Zellen gemessen. Hierauf wurden der Stimulationsindex (MV-spezifische Stimulation/Medium Stimulation) berechnet.

3.4. Präparation von Plasmid-DNS

Für die Präparation der unterschiedlichen Plasmide wurde der Quiagen "Plasmid Maxi Kit" verwendet. Hierbei wurde wie vom Hersteller angegeben verfahren. Über Nacht wurde eine 250 ml Bakterienkultur, welche mit dem zu isolierenden Plasmid transformiert worden war, unter Selektionsdruck gezogen und die Bakterien am nächsten Morgen abzentrifugiert (4°C, 15 min., 6000g). Das Pellet wurde in 10 ml Puffer gut resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer 2 und vorsichtigem Schütteln wurden die Zellen für 5 min. bei RT lysiert. Es wurden zur Neutralisation 10 ml Puffer 3 zugegeben, bei 4°C für 20 min. auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min. bei 4°C und 27000g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter filtriert und auf eine Qiagen-Säule gegeben, die mit 10 ml Äquilibrationpuffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 15 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert und mit dem 0,7 fachen Volumen Isopropanol bei RT präzipitiert. Sofort nach Zugabe des Isopropanols wurde gemischt und für 30 min. bei 4°C und 10000g zentrifugiert. Die gefällte DNS wurde zweimal mit 10 ml 70 % EtOH gewaschen und in ca. 200-400µl steriles PBS aufgenommen.

3.4.1. Bestimmung der DNS-Konzentration und des Reinheitsgrades

Zur Bestimmung der DNS-Konzentration wurde die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Hierzu wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. 1 A_{260} -Einheit ist als die Substanzmenge bestimmt, die gelöst in 1 ml bei einer Wellenlänge von 260 nm die Extinktion 1 ergibt. 1 A_{260} -Einheit entspricht in etwa 50 µg Doppelstrang-DNS. Um den Reinheitsgrad der DNS zu überprüfen, wurde ebenfalls die Extinktion bei 280 nm gemessen. Der Quotient A_{260}/A_{280} beschreibt den Gehalt an Proteinverunreinigungen. Dieser Quotient sollte im Falle einer DNS-Immunsierung einen Wert von $\geq 2,0$ aufweisen. Die Konzentration der eingesetzten DNS sollte im Bereich von 1,5-2 µg/µl liegen.

3.5. Immunchemie

3.5.1. Reinigung von Immunglobulinen

3.5.1.1. Hybridoma-Überstand

Um größere Mengen an monoklonalen Antikörpern die gegen das Fusionsprotein, das Hämagglutinin- und Nukleokapsid Protein gerichtet sind zu erhalten, wurde der Zellkulturüberstand von folgenden Hybridoma-Linien aufgereinigt: A504 (Maus monoklonaler Antikörper anti-MV-F), L77 (Maus monoklonaler Antikörper anti-MV-H) und F227 (Maus monoklonaler Antikörper anti-MV-N). Hierzu wurden je 5×10^7 Hybridomazellen in 500 ml Medium in Rollerflaschen ausgesät und bei 37°C inkubiert, bis sich das Medium gelb färbte und lichtmikroskopisch der beginnende Zelluntergang zu beobachten war. Der Überstand wurde zweifach durch Faltenfilter filtriert. Noch vorhandene Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation ($1540 \times g$, 4°C , 10 Minuten) abgetrennt. Anschließend wurde der gereinigte Überstand in der Affinitätschromatographie weiter verarbeitet.

3.8.1.2. Affinitätschromatographie mit Protein G

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen Bindung immobilisierter Liganden und dem zu reinigenden Protein. Die Liganden sind kovalent an ein Trägermaterial (z.B. Agarose) gebunden. Als Liganden zur Reinigung monoklonaler Antikörper werden v.a. gruppenspezifische Liganden wie Protein G (Oberflächenprotein von Streptokokken) gewählt, welches hoch affine Bindungsstellen für den Fc-Teil von Immunglobulinen besitzt. Es wurde gebrauchsfertige, ligandengekoppelte Agarose (Protein G Sepharose) der Firma Pharmacia verwendet. Die Chromatographiesäule wurde mit 5 ml Sepharose G Suspension gefüllt (1 ml Trägermaterial kann 5-10 mg Immunglobulin binden) und mit 25 ml Bindungspuffer äquilibriert. Der Hybridoma-Überstand wurde unverdünnt 24-72 Stunden bei 4°C auf die Säule aufgetragen. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule anschließend mit 30 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Dissoziation der gereinigten Antikörper von dem Liganden erfolgte durch einen Elutionspuffer. Die Elution wurde UV-spektrometrisch kontrolliert, die Elution der Antikörper war als ein einzelner, scharfer Ausschlag im UV-Absorptionsspektrum zu verfolgen. Das Eluat wurde sofort mit 1 M Tris-Puffer auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt, um die Stabilität des Antikörpers zu gewährleisten. Anschließend wurde der Antikörper gegen PBS 48 Stunden bei 4°C dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay I durchgeführt. Als Standardprotein wurde bovines Immunglobulin verwendet. Bei jedem Test wurde eine Eichkurve mit Standardkonzentrationen von 1-15 mg erstellt, sowie ein Leerwert mitgeführt. $10 \mu\text{l}$ der

Proben wurden mit 1 ml Färbelösung gemischt. Nach 5-30 Minuten wurde die optische Dichte des entstandenen Farbstoffes am Photometer bei 595 nm gegen den Leerwert gemessen. Die Proteinkonzentration der gemessenen Proben wurden aus der Eichkurve abgelesen. Nach Proteinbestimmung wurde der Antikörper aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Die Säule wurde nach Benutzung mit 15 ml Desinfektionspuffer gewaschen und bei 4 °C gelagert.

3.5.2. Immunfluoreszenz

Um die Expression des MV-Hämagglutinin durch das rekombinante VSV-H Virus zu überprüfen, wurden BHK 21 Zellen mit VSV-H infiziert und das MV-Hämagglutinin in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Hierzu wurden BHK 21 Zellen auf Deckgläschen (11mm Durchmesser) in einer 24-Lochplatte ausgesät (10^5 Zellen pro Loch) und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit MEM wurden die Zellen mit VSV-H (M.O.I. von 0,001) für 1h bei 37°C infiziert. Anschließend wurde das Inokulum abgesaugt, die Zellen einmal gewaschen und nach Zugabe von MEM 5 % FKS für 10-12h bei 37°C inkubiert. Hierauf wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und zum fixieren der Zellen 10 min mit 3,7 % Formaldehydlösung bei RT inkubiert. Zum Anfärben von intrazellulärem Hämagglutinin wurden die Zellen für 5 min mit einer 0,25 %igen Tritonlösung permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und 100 µl (10µg/µl) monoklonaler L77 Antikörper (anti-H) zugegeben. Nach 1h Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal gewaschen und anschließend mit 100 µl FITS-anti-Maus-Antikörper (1:100) für 1h bei 4°C inkubiert. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf den Objektträger transferiert und zur Expressionskontrolle unter dem Immunfluoreszenzmikroskop untersucht.

3.5.3. Antikörpernachweis

3.5.3.1. ELISA

Mit der ELISA-Technik können die Konzentrationen von Antikörpern über die Aktivitätsbestimmung eines Markerenzym ermittelt werden. Der nachzuweisende Probenantikörper bindet im ersten Reaktionsschritt an festphasenadsorbiertes Antigen. Die gebundenen Antikörper werden im zweiten Reaktionsschritt durch enzymmarkierte Anti-Spezies-Antikörper nachgewiesen (Engvall und Perlmann, 1972).

3.5.3.1.1. ELISA zum Nachweis MV-spezifischer IgG Antikörper aus der Baumwollratte

Zum Nachweis MV-spezifischer Antikörper wurden 96-Näpfe-Platten mit Rundboden (Nukleobond) mit 100µl gereinigtem MV-Antigen (10µg/ml) oder als Negativkontrolle mit 100µl Verozellysat-Antigen am Vortag beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer gewaschen und zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen 30 Min. mit 100 µl Blockierungs Puffer pro Napf inkubiert. 10 Min. vor Ablauf der Absättigungsreaktion wurden die Platten in den 4°C Kühlraum transferiert. Die zu testenden Seren wurden 1:100 mit Verdünnungspuffer gemischt und auf Eis gestellt. Bei 4°C wurden pro Napf 100µl der unterschiedlichen Serumverdünnungen pipettiert und die Ansätze bei 4°C für 60 Min. inkubiert. Die Proben wurden jeweils im Doppelansatz bestimmt. Anschließend wurden die Platten fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und in jeden Napf 100 µl eines polyklonalen Kaninchen-anti-Baumwollratten-IgG Serums (1:3000) pipettiert und für 60 Min. bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde 100 µl Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper(1:3000) zugegeben und für 45 Min. bei RT inkubiert. Nach erneutem fünfmaligen Waschen wurde 100µl Substratlösung (0,5mg/ml Orthophenylendiamin, 0.01 % H₂O₂ in Substratpuffer) in jeden Napf pipettiert und 10-15 Min. im Dunkeln bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl konzentrierte Schwefelsäure wurde die Reaktion beendet und die optische Dichte am ELISA-Reader bei einer Absorption von 492 nm gemessen. Als Positivkontrolle diente ein MV-spezifisches Baumwollrattenhyperimmunserum mit bekanntem ELISA-Titer, als Negativkontrolle ein Baumwollrattenpräimmunserum.

3.5.3.1.2. ELISA zum Nachweis MV-spezifischer humaner IgG Antikörper

Zum Nachweis von humanen MV-spezifischen Antikörpern wurden 96-Näpfe-Platten mit Rundboden (Nukleobond) mit 100µl gereinigtem MV-Antigen (10µg/ml) am Vortag beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer gewaschen und zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen 30 Min. mit 100 µl Blockierungs Puffer pro Napf inkubiert. Die zu testenden Seren wurden 1:100 mit Verdünnungspuffer gemischt und in die Näpfe pipettiert. Die Proben wurden jeweils im Doppelansatz bestimmt und bei RT für 60 Min. inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und in jeden Napf 100 µl eines Peroxidase-gekoppelten polyklonalen Kaninchen-anti-human-IgG Serums (1:1000 in Verdünnungspuffer) pipettiert und für 60 Min. bei RT inkubiert. Nach Fünfmaligem Waschen wurde 100µl Substratlösung (0,5mg/ml Orthophenylendiamin, 0,01 %

H₂O₂ in Substratpuffer) in jeden Napf pipettiert und 10-15 Min. im Dunkeln bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl konzentrierter Schwefelsäure wurde die Reaktion beendet und die optische Dichte am ELISA-Reader bei einer Absorption von 492 nm gemessen. Als Positivkontrolle diente ein MV-spezifisches Humanserum (HHT = 256; Virologie, Würzburg). Unter Verwendung eines WHO-Referenzserums (2nd International Standard 1990, 5 IU/ml, National Institute for Biological Standards and control, Potters Bar, UK) konnte der Titer an humanen MV-spezifischen Antikörpern in internationalen Einheiten (IU) bestimmt werden.

3.5.3.2. Neutralisationstest

Um die virusneutralisierende Eigenschaft von bestimmten Antikörpern oder Seren zu charakterisieren wurde der Neutralisationstest verwendet. In diesem Testsystem wird die biologische Eigenschaft, die Infektion permissiver Zellen mit infektiösen Viruspartikeln *in vitro* zu inhibieren, untersucht.

3.5.3.2.1. Masernvirus Neutralisationstest

Zum Nachweis MV-neutralisierender Antikörper wurde ein Mikroneutralisationstest in 96-Mikrotiterplatten durchgeführt. Von den zu testenden Seren wurden Verdünnungsreihen in Zweierschritten durchgeführt und je 50 µl/Napf auf die Mikrotiterplatte verteilt. Anschließend wurden pro Napf 50 TCID₅₀ MV (1 TCID₅₀ ist diejenige Infektionsdosis, die ausreicht, um 50% einer Gewebekultur zu infizieren) in 50 µl MEM zugegeben. Die Platten wurden 60 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden 1x10⁴ Verozellen in 100 µl MEM/10% FKS in jeden Napf pipettiert und die Platten im Brutschrank aufbewahrt. Nach 4 bis 5 Tagen wurde der MV-spezifische CPE lichtmikroskopisch untersucht. Der Endtiter neutralisierender Antikörper wurde als diejenige Serumverdünnung angegeben, bei der in Doppelbestimmungen das MV gerade noch neutralisiert wurde, d.h. kein CPE nachweisbar war. Als Positivkontrolle diente ein MV-spezifisches Baumwollrattenhyperimmunserum mit bekanntem Neutralisationstiter. Als Negativkontrolle ein naives Baumwollrattenserum.

3.5.3.2.2. MV-spezifischer Plaque Reduktionsneutralisationstest (PRNT)

Eine ca. zehnfach sensitivere Methode zum Nachweis MV-neutralisierender Antikörper ist der Plaque Reduktionsneutralisationstest.

Hierzu wurden je 5×10^5 Verozellen am Vortag in den Nöpfen einer 6-Cluster-Platte ausgesät. Am nächsten Tag waren die Zellen zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen. Die zu untersuchenden Seren wurden 1:10 mit MEM versetzt und dann in Zwischenschritten weiter verdünnt. Zu jeder Serumverdünnung wurden 100 PBE MV zugegeben und der Ansatz für 60 Min. im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1ml der unterschiedlichen Ansätze zu den Vero Zellen pipettiert und nach 60 Min. Inkubation wieder abgezogen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Top-Agar überschichtet. Dieser setzte sich aus 7,5 ml 2%igem Agar, 7,5 ml doppelt konzentriertem MEM und 5 ml MEM/5 % FCS zusammen. Nach Abkühlen und Verfestigung des Agars wurden die Platten für etwa 3 Tage im Brutschrank bis zum Auftreten eines deutlichen CPE inkubiert. Um das Auszählen der Plaques zu erleichtern, wurde in jeden Napf 1 ml einer 1:100 in PBS verdünnten Neutralrotlösung gegeben. Nach einer Stunde wurde der Überstand abgezogen und nochmals im Brutschrank inkubiert bis die Plaques deutlich zu sehen waren. Die Seren wurden jeweils in einer Doppelbestimmungen untersucht. Als Positivkontrolle diente ein MV-spezifisches Baumwollrattenhyperimmunserum mit bekanntem Neutralisations-Titer und als Negativkontrolle wurde ein naives Baumwollratten Serum verwendet. Mit dem Plaque Reduktionsneutralisationstiter wird die Serumverdünnung ermittelt die in der Lage ist das Inokulum von 100 PBE MV auf die Hälfte (50 PBE MV) zu reduzieren.

3.5.3.2.3. VSV-spezifischer Neutralisationstest (NT bzw. PRNT)

Zum Nachweis VSV-neutralisierender Antikörper wurde ebenfalls ein Mikroneutralisationstest (siehe 3.5.3.2.1.) in 96-Mikrotiterplatten bzw. ein Plaque Reduktionsneutralisationstest siehe 3.5.3.2.2. in 6-Loch Platten durchgeführt. Im Unterschied zu 3.8.3.2.1. wurden die zu testenden Seren mit 50 bzw. 100 TCID₅₀ VSV (VSV-Indiana bzw. VSV-H, CT 9, CT 1) inkubiert und als permissive Zellen BHK 21 Zellen verwendet. Die Titerbestimmung erfolgte bereits nach 24-48h bei VSV-Indiana und VSV-H, bzw. nach 48-72h bei CT 9 und CT1.

3.6. Virologische Methoden

3.6.1. Masernvirus Anzucht (MV-Edmonston, MV-Hu2)

Verozellen wurden so ausgesät, daß sie einen Tag später zu einem ca. 70 - 90 % konfluenten Zellrasen gewachsen waren. Hierauf wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 2 Stunden mit MV in 10 ml MEM ohne FKS mit einer M.O.I. von 0,002 infiziert. Dann wurde das Medium abgesaugt, DMEM/2 % FKS zugegeben und die Zellen für 3-4 Tage bei 33°C inkubiert. Sobald der zytopathische Effekt zu mindestens 90 % ausgebildet war, wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und 5 ml steriles PBS zugegeben. Um die Zellen zu desintegrieren, wurden die Flaschen bei -20°C für mindestens 2 Stunden eingefroren. Durch rasches Auftauen und heftiges Schwenken der Eisstücke über den Zellrasen wurden die Zellen aufgebrochen. Zusätzlich wurde nach Auftauen der Lösung mehrmals mit einer 10 ml Pipette suspendiert. Die Zelltrümmer wurden durch 10-minütige Zentrifugation (1540 x g, 4°C, 10 Minuten) abgetrennt. Der virushaltige Überstand wurde in vorgekühlte Schraubdeckelröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Da MV sehr temperaturempfindlich ist, war es wichtig, die Viruspräparation schnell und bei niedrigen Temperaturen durchzuführen. Der Virustiter wurde von einem wieder aufgetauten Aliquot mittels Plaquetest bestimmt.

3.6.2. Plaquetest

Je 5×10^5 Verozellen wurden am Vortag in den Näpfen einer 6-Cluster-Platte ausgesät. Die Zellen waren am nächsten Tag zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen. Der Virusstock wurde in MEM Medium in Zehnerschritten verdünnt. Die Zellen wurden dann mit je 1 ml der Verdünnung infiziert. Nach 60 Min. Inkubation wurde das Inokulum abgezogen und die Zellen mit 3 ml Top-Agar überschichtet. Dieser setzte sich aus 7,5 ml 2%igem Agar, 7,5 ml doppelt konzentriertem MEM und 5 ml MEM/5 % FCS zusammen. Nach Abkühlen und Verfestigung des Agars wurden die Platten für etwa 3-5 Tage im Brutschrank bis zum Auftreten eines deutlichen CPE inkubiert. In jeden Napf wurde nun zur Sichtbarmachung der Plaques 1 ml einer 1:100 in PBS verdünnten Neutralrotlösung gegeben. Nach einer Stunde wurde der Überstand abgezogen und nochmals im Brutschrank inkubiert bis die Plaques ausgezählt werden konnten. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Anzahl der Plaques verschiedener Verdünnungsstufen wurden gemittelt und für die Berechnung der Virustiter verwendet.

3.6.3. VSV-Zucht (VSV-Indiana, VSV-H, CT 9-H, CT 1-H)

BHK 21 Zellen wurden 1:5 geteilt, in einer 250 ml Zellkulturflasche ausgesät und für ca. 2 Tage bei 37°C inkubiert, bis sich ein 90-95 % konfluenter Zellrasen gebildet hatte. Anschließend wurde das Medium abgezogen und die Zellen für 2 Stunden mit VSV in 5 ml MEM ohne FKS mit einer M.O.I. von 0,001 infiziert. Nach Abziehen des Inokulum wurden die Zellen mit MEM 5 % FKS versetzt und für 16-24h (VSV-Indiana, VSV-H, CT 9-H) bzw. für 24-48h (CT 1-H) bei 37°C bis zur Ausbildung eines deutlichen CPE (Zellen kugeln sich stark ab) inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgenommen und 5 ml MEM zugegeben. Die infizierten Zellen wurden mit Hilfe eines Zellkulturschabers von der Oberfläche des Zellkulturbodens abgekratzt mit einer 5 ml Pipette resuspendiert und in ein vorgekühltes Greiner Röhrchen überführt. Durch zweimaliges Frieren-Tauen wurden die Zellen desintegriert. Nach anschließendem Abzentrifugieren (1540g, 15 min, 0°C) wurde der virushaltige Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der Virustiter wurde von einem wieder aufgetauten Aliquot mittels Plaquetest bestimmt.

3.6.4. VSV Plaque Test

Je 5×10^5 BHK 21 Zellen wurden am Vortag in den Näpfen einer 6-Cluster-Platte ausgesät. Die Zellen waren am nächsten Tag zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen. Der Virusstock wurde in MEM Medium in Zehnerschritten $1:1 \times 10^2$ bis zu $1:1 \times 10^7$ verdünnt. Die Zellen wurden mit je 1 ml der unterschiedlichen Verdünnungen infiziert. Nach 60 Min. Inkubation wurde das Inokulum abgezogen und je 3ml MEM 5 % FKS pro Napf zugegeben. Anschließend wurden die Zellen bis zum Auftreten eines deutlichen CPE (16-20h bei VSV-Indiana, VSV-H, CT 9-H und 24-48h bei CT 1-H) bei 37°C inkubiert. Dann wurde der Überstand vorsichtig abgezogen. Um das Auszählen der Plaques zu erleichtern wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Nach dem Absaugen der Kristallviolettlösung wurden die Platten nochmals über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Anzahl der Plaques verschiedener Verdünnungsstufen wurden gemittelt und für die Berechnung der Virustiter verwendet.

3.6.5. Gewinnung von Masernvirusantigenen

Zum Beschichten von ELISA-Platten und zur *in vitro* Stimulation von Baumwollrattenlymphozyten wird Masernvirusantigen in gereinigter Form benötigt. Um eine gute Ausbeute zu erhalten wurden für die Aufarbeitung von MV-Partikeln nur hochtitrige MV-Stocks verwendet (siehe 3.9.1. MV-Zucht). Hierzu war es auch notwendig, daß sämtliche Schritte der Virusreinigung auf Eis und in vorgekühlten Geräten durchgeführt wurden. Die Virusstocks wurden in 50 ml Polyallomerröhrchen (Kontron) auf ein Sucrosekissen (5 ml 25% Sucrose w/w in NTE) pipettiert. Durch Ultrazentrifugation mit dem Ausschwingrotor vom Typ SW 28 (100.000 x g, 4°C, 90 Minuten) wurden die Viruspartikel sedimentiert. Das Sediment wurde kurz eingefroren, in dem dreifachen Volumen NTE-Puffer resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung im Branson Sonifier 450 (duty cycle 6, output control 30%) dispergiert. Anschließend wurde das Virusmaterial durch Dichtezentrifugation in einem diskontinuierlichen Sucrosegradienten angereichert. Der Gradient (10 ml 30%, 10 ml 50%, 5 ml 60%) wurde mit der in NTE enthaltenen Viruslösung überschichtet und 120 Minuten ultrazentrifugiert (100.000 x g, 4°C), so daß sich auf der 50%igen Sucrose (MV-Partikel) sowie auf der 30%igen Sucrose (Glykoproteine F und H) eine sichtbare Proteinbande ausbildete. Beide Banden wurden mit Hilfe einer Kapillare abgenommen, mit NTE mindestens 1:3 verdünnt und durch eine erneute Ultrazentrifugation (100.000 x g, 4°C, 90 Minuten) im Pellet konzentriert. Das Pellet wurde in PBS aufgenommen, kurz beschallt und nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Biorad) auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Die Anwendung des Virusmaterials zur Lymphozytenstimulation machte eine 15 minütige UV-Behandlung erforderlich, bevor das Virus zur weiteren Verwendung aliquotiert und bei -80 °C eingefroren wurde. Die UV-Inaktivierung wurde durch Titration von UV-behandeltem MV auf Verozellen überprüft. Bei vollständiger Inaktivierung konnte kein virusinduzierter zytopathischer Effekt nachgewiesen werden.

3.7. Tierexperimentelle Methoden

3.7.1. Intraperitoneale Immunisierung von Baumwollratten

Um die systemische Immunantwort von Baumwollratten nach Immunisierung mit MV und VSV-H zu untersuchen, wurden Tiere mit unterschiedlichen Dosen an MV bzw. VSV-H intraperitoneal immunisiert. Für die Immunisierung wurden die Tiere in leichte Ethernarkose versetzt. Je nach Immunisierungsdosis wurden Volumina von 100 μ l und 5ml eingesetzt und als Trägermedium sterile physiologische Kochsalzlösung oder PBS verwendet. Für die Injektion wurde in Abhängigkeit von der Immunisierungsdosis eine sterile Einwegspritze (1ml bzw. 5ml Volumen) verwendet. Der Einstich erfolgt im unteren linken Quadranten des Abdomens (Abb.1), da sich dort außer dem Dünndarm keine lebenswichtigen Organe befinden.

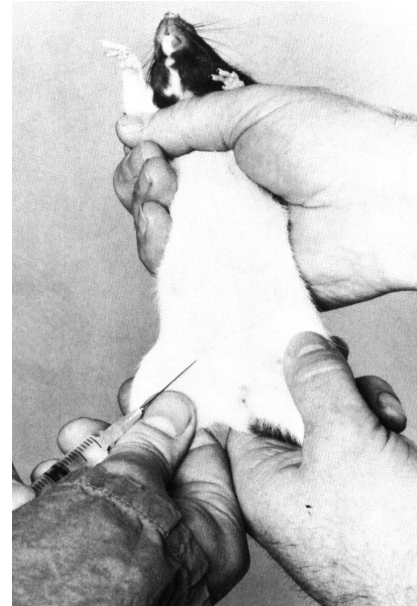


Abb. 1: intraperitoneale Immunisierung nach Waynforth und Flecknell

Hierzu wurde die Kanüle am linken unteren Quadranten des Abdomens angelegt und zuerst nur subkutan eingeführt. Mit einer ruckartigen Bewegung, bei nahezu senkrecht gehaltener Spritze, wurde die abdominale Muskulatur durchdrungen und anschließend der Inhalt der Spritze in die Peritonealhöhle überführt.

3.7.2. Intranasale Immunisierung von Baumwollratten

Zur gezielten Immunisierung des Schleimhaut-assoziierten Immunsystems wurden Baumwollratten intranasal mit unterschiedlichen Dosen an MV bzw. VSV-H immunisiert. Das maximale Immunisierungsvolumen für 3-4 Wochen alte Baumwollratten betrug 50 μ l. 6 Wochen alten oder älteren Tieren konnte auch ein Volumen von bis zu 100 μ l verabreicht werden. Als Trägermedium wurde sterile physiologische Kochsalzlösung oder PBS verwendet. Für die Immunisierung wurden die Baumwollratten in tiefe Ethernarkose versetzt und das Inokulum mit Hilfe einer 200 μ l Gilson-Pipette und sterilen gelben Spitzen in die Nasenöffnung des Versuchstieres überführt. Durch die Atmung des Versuchstieres gelangte die Immunisierungslösung schließlich in die Lunge.

3.7.3. Orale Immunisierung von Baumwollratten

Zur gezielten Stimulation des Darm-assoziierten und mukosalen Immunsystems wurden Baumwollratten oral mit unterschiedlichen Dosen an VSV-H immunisiert. Hierzu wurden Baumwollratten in tiefe Ethernarkose versetzt. Für die Applikation wurde eine 2-5 ml Glasspritze mit einer gekrümmten 6-10 cm langen und am vorderen Ende abgerundeten Knopfkanüle verwendet (Abb 2). Vor dem Einführen der Kanüle wurde der Abstand zwischen Mund und Magen abgeschätzt. Beim Einführen war dies ein wichtiger Anhaltspunkt, wie weit die Kanüle intubiert werden mußte. Die Kanüle wurde seitlich in den Mund eingeführt und durch eine gleitende Bewegung seitlich an der Mundinnenwand entlang bis zum Eingang des Ösophagus geführt. An dieser Stelle war es günstig, durch kurze Vor- und Rückwärtsbewegungen der Kanüle den Eintritt in die Speiseröhre zu erleichtern. In der Speiseröhre angelangt wurde die Injektionslösung durch leichtes Drücken in den Magen transferiert.

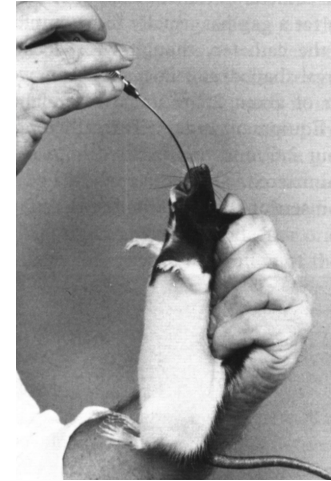


Abb. 2: orale Immunisierung
nach Waynforth und Flecknell

3.7.4. Intratracheale Immunisierung von Baumwollratten

Um eine Immunisierung des unteren Respirationstraktes zu erhalten, wurden Baumwollratten intratracheal mit unterschiedlichen Dosen an MV bzw. VSV-H immunisiert. Für diese Immunisierungsart war eine spezielle Haltevorrichtung (Abb. 3) und die Hilfe eines Assistenten äußerst hilfreich. Da der gesamte Immunisierungsvorgang hier deutlich mehr Zeit in Anspruch nahm, erwies es sich als günstig die Tiere mit Methoxyfluran, anstelle von Ether, zu narkotisieren. Hierzu wurden Baumwollratten für 5 min. mit Methoxyfluran narkotisiert und anschließend in die Apparatur gespannt. Ein Experimentator befestigte die Vorderläufe an zwei an der Apparatur vorgefertigten

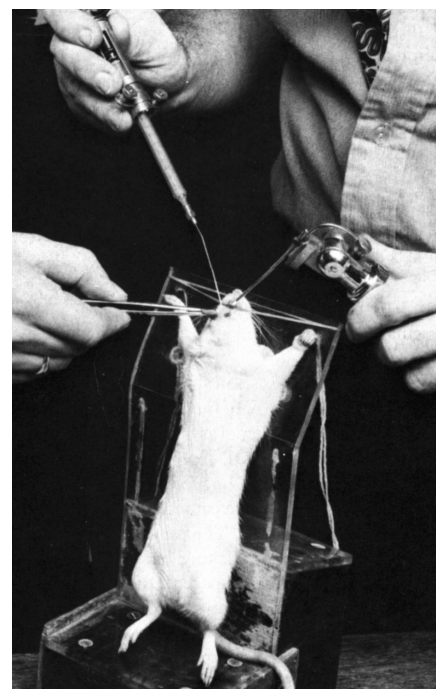


Abb. 3.: intratracheale Immunisierung
nach Waynforth und Flecknell

Schlaufen, während der Zweite den Kopf fixierte, indem er ein Gummiband über den Schädel spannte und hinter die Schneidezähne klemmte. Nun wurde ein gekrümmter Polyethylenschlauch (ca. 0,1 mm Innendurchmesser), an dem eine Tuberkulinspritze angeschlossen war, eingeführt. Gleichzeitig wurde der Rachenraum mit einem Larygoskop ausgeleuchtet und bei erfolgreicher Intubation ein Inokulum von 50µl transferiert.

3.7.5. Intrazerebrale Immunisierung von Baumwollratten

Um die VSV-H spezifische Immunantwort im Gehirn von Baumwollratten zu untersuchen wurden Tiere intrazerebral mit unterschiedlichen Dosen von VSV-H immunisiert. Hierfür wurden 3-4 Wochen alte Baumwollratten verwendet. Für die Inokulation wurde eine Tuberkulinspritze verwendet, die in einer automatischen Pipettiervorrichtung eingespannt war und bei jedem Betätigen der Pipette jeweils 25µl Flüssigkeit luftblasenfrei transferierte. Für die Immunisierung wurden die Tiere in tiefe Ethernarkose versetzt und anschließend ventral positioniert. Hierbei wurde der Kopf von einem Assistenten an der Schnauze und hinter den Ohren mit Daumen und Zeigefinger fixiert.

3.7.6. DNS-Immunisierung

Für die DNS-Immunisierung wurden die folgenden Plasmide verwendet: pCGF₁ (exprimiert MV-Fusionsprotein), pCGH₅ (exprimiert MV-Hämagglutininprotein), pSC-N (exprimiert MV-Nukleokapsidprotein) und pCDNA3 (Stimulator-DNS).

3.7.6.1. Intramuskuläre DNS-Immunisierung

Für die intramuskuläre DNS-Immunisierung von Baumwollratten wurde der Gluteus Semitendinosus-Muskel der Hinterläufe ausgewählt (Abb. 4). Für die Injektion wurde eine 1 ml Tuberkulinspritze mit einer 0,5 ml langen Kanüle verwendet. Die Tiere wurden in leichte Ethernarkose versetzt und fünf Tage vor Immunisierungsbeginn wurde in die Hinterläufe je 150µl (10Mm in PBS) Cardiotoxin injiziert, um die DNS-Aufnahme zu erhöhen und dadurch eine verbesserte Immunantwort zu erreichen. Um die optimale Immunisierungsdosis zu erhalten wurden unterschiedliche

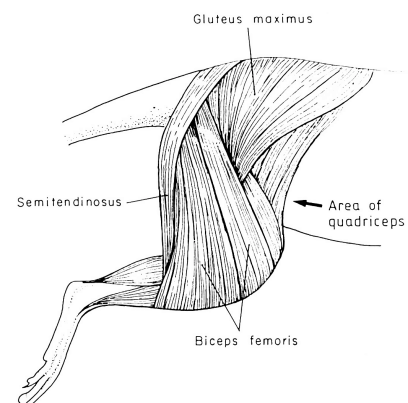


Abb. 4.: intramuskuläre DNS-Immunisierung nach Waynforth und Flecknell

Mengen an MV-spezifischer DNS gemischt mit Adjuvans-DNS in einer Konzentration von 1.5-2 µg/µl injiziert. Das maximale Immunisierungsvolumen betrug 150 µl, wobei die Plasmide in physiologischer Kochsalzlösung oder in PBS gelöst waren. Drei Wochen nach der ersten Immunisierung wurde eine Wiederholungs-Immunisierung mit der gleichen Menge an Plasmid-DNS durchgeführt.

3.7.6.2. Intradermale DNS-Immunisierung

Als alternative Immunisierungsrouten zur intramuskulären DNS-Immunisierung wurde auch die intradermale Immunisierungsrouten mit MV-spezifischen Plasmiden evaluiert. Vor der Immunisierung wurden die lateralen Flanken mit einem Kurzhaarschneider abrasiert. Für die Injektion wurden zwei 1 ml Tuberkulinspritzen verwendet. Hierzu wurde zwischen Daumen und Zeigefinger eine Hautfalte der lateralen Flanke fixiert und die Kanüle nahezu horizontal in die Haut eingeführt (maximal 2-3 mm). Bei erfolgreicher Applikation war eine deutliche Blasenbildung zu erkennen. Das injizierte Volumen war maximal 50µl pro Depot, wobei zwei Depots (ein Depot pro Flanke) gesetzt wurden. Drei Wochen nach der ersten Immunisierung wurde eine Booster-Immunisierung mit der gleichen DNS Menge durchgeführt.

3.7.7. Blutentnahme und Serumgewinnung

Für kinetische Untersuchungen der MV-spezifischen Antikörperproduktion wurde Baumwollratten unter leichter Ethernarkose aus dem retroorbitalen Plexus (Abb. 7) im Wochenabstand Blut entnommen. Getöteten Baumwollratten wurde Blut durch Herzpunktion entnommen. Zur Serumgewinnung wurde das Blut direkt in Röhrchen (serum separator tubes, Mikrotainer) überführt und zentrifugiert (20 sec., 14000 rpm). Die Seren wurden abgenommen und bis zum Gebrauch auf -20°C oder bei 4°C gelagert.

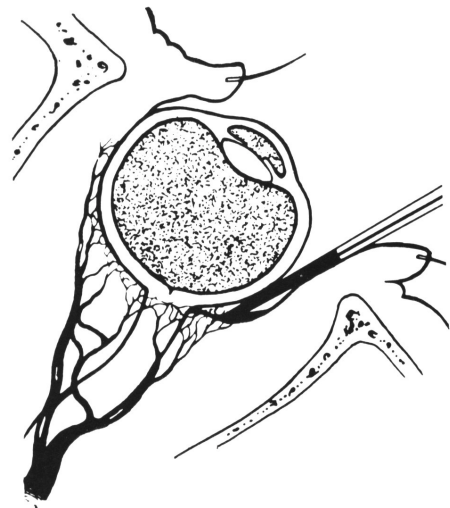


Abb. 5.: retroorbitale Blutentnahme nach Waynforth und Flecknell

3.7.8. Schutzversuche und Histologie

Da Baumwollratten das einzige Nagetiermodell für eine respiratorische Infektion mit Masernviren sind, kann hier das Potential unterschiedlicher Immunisierungsvektoren, vor einer intranasalen Infektion mit Masernviren zu schützen, untersucht werden. Hierzu wurden immunisierte und naive Baumwollratten mit 2×10^5 PBE MV-Hu2 (MV-Edmonston-Stamm, der bei einem geimpften Kind eine Enzephalitis hervorgerufen hat (Rima, 1993)) intranasal infiziert und nach fünf Tagen, wenn der MV-Titer seinen höchsten Wert erreicht hatte, durch CO₂-Inhalation getötet. Anschließend wurde die Peritonealhöhle und der Brustkorb vorsichtig eröffnet und ,um Blutungen im Brustraum zu vermeiden, das Herz punktiert und die Nieren angeschnitten. Hierauf wurde die Luftröhre frei präpariert und die Lunge als Einheit mit Herz und Luftröhre entnommen. Nachdem das Herz abgetrennt und die Lunge von anhaftenden Fett- und Bindegewebsstücken gesäubert worden war, wurde der linke Lungenflügel mit einem Nylonfaden abgebunden, mit einer Schere abgetrennt und für die Virusrückisolierung auf Eis gestellt. Die drei rechten Lungenflügel wurden mit Hilfe einer 10 ml Spritze mit PBS 4 % Formaldehyd auf physiologische Größe aufgeblasen, in ein 50 ml Röhrchen mit 40 ml PBS 4 % Formaldehyd überführt und für histologische Untersuchungen bei 4°C aufbewahrt. Die histologische Bewertung der Baumwollrattenlungen wurde von Dr. Paul Georg Germann, Novartis Basel, vorgenommen.

Mit dem linken Lungenflügel wurde eine Virusrückisolierung zur Ermittlung der Virustiter im Lungengewebe durchgeführt. Hierzu wurde das Organ zuerst gewogen, anschließend mit einer Schere in kleine Stücke zerschnitten und in einen 15 ml Glashomogenisator überführt. Daraufhin wurde 1 ml vorgekühltes MEM-Medium zupipettiert und das Ganze auf Eis homogenisiert. Von dem Homogenat wurden Verdünnungen in Zehnerschritten durchgeführt, die unterschiedlichen Verdünnungsstufen zu Vero-Zellen pipettiert und für 60 min. bei 37°C inkubiert. Die Vero Zellen wurden mindestens 2h zuvor in eine 48-Loch-Platte ausgesät (10^5 -Zellen/Loch). Für die Infektion wurden jeweils 166 µl der einzelnen Verdünnungsstufen in die 6 Löcher einer Spalte pipettiert, so daß insgesamt 1ml pro Verdünnungsstufe ausplattiert wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Näpfe dreimal mit PBS gewaschen, 0,5 ml MEM 5 % FKS pro Loch zugegeben und für 5-6 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Löcher mit positivem CPE markiert und die Virusmenge bestimmt, die benötigt wird, um 50 % der Zellkulturplatte zu infizieren (TCID₅₀). Für die Berechnung der TCID₅₀ wurde das Verfahren nach Reed und Muench verwendet (REED et al., 1938). Die Protektion wurde gemessen als Reduktion im Virustiter im Vergleich zu nicht immunisierten Tieren.

4. Ergebnisse

4.1. Baumwollratten als Tiermodell für die Inhibition der Vakzine-induzierten Serokonversion

Kleinkinder besitzen innerhalb des ersten Lebensjahres ein hohes Risiko an Masern zu erkranken und der Anteil an schweren Krankheitsverläufen mit letalem Ausgang ist in dieser Altersgruppe besonders hoch. Aus diesem Grund wäre es wichtig, Kleinkinder in den ersten Lebensmonaten erfolgreich gegen Masernvirusinfektionen zu impfen. Da eine erfolgreiche Immunisierung mit dem derzeitigen MV-Impfstoff im ersten Lebensjahr aufgrund der Präsenz von maternalen MV-spezifischen Antikörpern nicht möglich, ist es notwendig neuartige Impfstoffe zu entwickeln, die in Gegenwart maternaler Antikörper effektiv sind.

4.1.1. Modellsystem für natürliche maternale Antikörper

Um ein Modellsystem für natürliche maternale Antikörper zu entwickeln, wurden geschlechtsreife Baumwollratten zweimal im vierwöchigen Abstand mit 5×10^6 Plaque bildenden Einheiten (PBE) MV immunisiert. Nachdem diese Tiere eine starke MV-spezifische Immunantwort entwickelt hatten (Neutralisationstiter (NT) von 640; ELISA-Titer von 2,4 (OD-Wert)), wurden sie verpaart und ihre Nachkommen auf die Übertragung von MV-spezifischen maternalen Antikörpern untersucht. Wie beim Menschen, konnten auch bei Nachkommen von MV-immunen Baumwollratten abnehmende Titer an MV-spezifischen, maternalen Antikörpern nachgewiesen werden. Im ELISA konnten MV-spezifische maternale Antikörper für einen Zeitraum von mehr als 10 Wochen nachgewiesen werden. MV-neutralisierende Antikörper waren bis zu ca. 7 Wochen nach der Geburt präsent (Abb. 1).

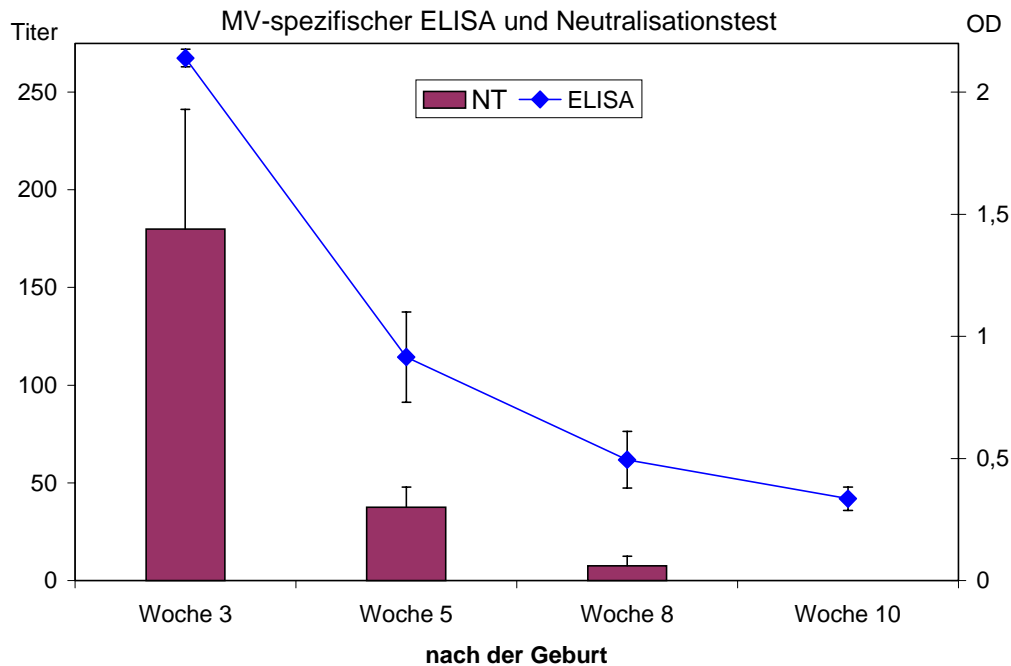


Abb.1: Abnahme maternalen Antikörper: Bei Nachkommen MV-immuner Baumwollratten wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Geburt Blut entnommen und die Titer an MV-spezifischen maternalen Antikörpern im ELISA bzw. NT bestimmt. Die Nachweisgrenze für MV-spezifische Antikörper liegt im ELISA bei einem OD-Wert von 0,2 und im NT bei einem Titer von < 10.

Um die Frage zu klären, ob maternale Antikörper wie beim Menschen eine Immunisierung mit dem MV-Impfstoff inhibieren, wurden 2 Gruppen von Nachkommen MV-immuner Baumwollratten untersucht. Eine Gruppe wurde 3 Wochen nach der Geburt intraperitoneal mit 5×10^6 PBE MV immunisiert, während die zweite Gruppe nicht immunisiert wurde (Kontrollgruppe). Als Positivkontrolle wurden gleichaltrige seronegative Baumwollratten mit 5×10^6 PBE MV immunisiert (Tab. 1).

Am Tag der Immunisierung konnte bei den Tieren mit maternalen Antikörpern hohe Titer an MV-spezifischen (OD = 2,1) und MV-neutralisierenden (NT = 140) Antikörpern nachgewiesen werden, während bei den naiven Tieren (ohne maternale Antikörper) keine MV-spezifischen Antikörper nachweisbar waren. Bei Baumwollratten, die in Gegenwart maternalen Antikörper immunisiert wurden, konnten 6 Wochen nach Immunisierungsbeginn keine MV-neutralisierenden Antikörper detektiert werden. Im ELISA konnten nur niedrige Titer an MV-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Der Unterschied war aber nicht signifikant erhöht im Vergleich zu Baumwollratten, die nicht immunisiert wurden.

3 Wochen alte	Immunisierung mit 5×10^6 PBE MV	Am Tag der Immunisierung		6 Wochen nach Immunisierung		Anzahl der Versuchstiere
		ELISA	NT	ELISA	NT	
Nachkommen mit maternalen Antikörpern	+	*2,1 ± 0,04	*140 ± 21	0,8 ± 0,2	< 10	3
	-	*2,0 ± 0,04	*180 ± 61	0,4 ± 0,1	< 10	3
Nachkommen ohne maternale Antikörper	+	0,2 ± 0,05	< 10	*1,8 ± 0,1	*160 ± 61,1	4
	-	0,2 ± 0,05	< 10	0,2 ± 0,05	< 10	4

Tab. 1.: 3 Wochen alte Baumwollratten mit bzw. ohne maternale Antikörper wurden intraperitoneal mit 5×10^6 PBE MV immunisiert. Als Kontrolle wurden gleichaltrige Tiere untersucht, die nicht immunisiert wurden. 6 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurde den Tieren Blut entnommen und der Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern im ELISA und NT bestimmt. Mit *-gekennzeichnete Werte sind statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Negativkontrolle.

Kontrolltiere, die keine maternalen Antikörper zum Zeitpunkt der Immunisierung besaßen, entwickelten hingegen eine ausgeprägte, hoch signifikante MV-spezifische Immunantwort.

Daraus ergibt sich, daß nach Immunisierung mit dem MV-Impfstoff in Gegenwart maternalen Antikörper die Vakzine-induzierte Serokonversion auch bei der Baumwollratte inhibiert wird. Obwohl diese Befunde denen beim Menschen entsprechen, haben natürliche maternale Antikörper als experimentelles System drei Nachteile: die Abnahme der Antikörper dauert lang (länger als 10 Wochen), die Antikörpertiter variieren stark zwischen den Nachkommen und aktiv generierte Antikörper können nicht von passiv transferierten unterschieden werden.

4.1.2. Alternatives Modellsystem für maternale Antikörper

Um diese Probleme zu umgehen, wurde ein alternatives Modellsystem für maternale Antikörper entwickelt. Hierzu wurde Baumwollratten ein Humanerum injiziert, das MV-spezifische Antikörper enthielt. Das verwendete Humanerum besaß einen sehr hohen Titer an MV-spezifischen Antikörpern (Neutralisationstiter = 320, Plaquereduktions-Neutralisationstiter = 3000). Im Westernblot wurde gezeigt, daß dieses Serum Antikörper gegen das MV-Hämagglutinin, -Fusionsprotein und -Nukleokapsidprotein enthielt. Um im ELISA den MV-spezifischen Antikörpertiter des Humanerums zu bestimmen, wurde ein WHO-Referenzserum (2^{nd} International Standard 1990, 5 IU/ml, National Institute for Biological Standards and control, Potters Bar, UK) verwendet. Hierbei konnte bei dem MV-spezifischen Humanerum einen ELISA-Titer von 16 IU/ml festgestellt werden.

4.1.2.1. Passiver Transfer eines Humanserums simuliert maternale MV-spezifische Antikörper

Nach intraperitonealer Injektion von 1ml Humanserum (16 IU) in Baumwollratten konnten MV-spezifische Antikörper für einen Zeitraum von 6 Wochen nachgewiesen werden (Abb.2 A). 6 Wochen nach Serumtransfer waren noch 26 mIU MV-spezifischer Antikörper nachweisbar. Nach 7 Wochen sank der MV-spezifische Antikörpertiter unter die Nachweisgrenze von 10 mIU. MV-neutralisierende Antikörper waren für 2 Wochen im Neutralisationstest und für 3 Wochen im 10-fach sensitiveren Plaquereduktions-Neutralisationstest nachweisbar (Abb. 2 B). Beim Menschen werden Antikörpertiter ≥ 120 mIU als protektiv beschrieben (Francisco et al., 1998) (Chen, et al., 1990). Dieser Wert wurde 3 Wochen nach Serumtransfer in diesem Modellsystem erreicht und korrelierte mit der Präsenz von MV-neutralisierenden Antikörpern in den ersten 3 Wochen nach Serumtransfer.

Um das protektive Potential des humanen MV-spezifischen Serums *in vivo* zu untersuchen, wurden Baumwollratten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Serumtransfer von 16 IU intranasal mit MV infiziert und 5 Tage später der Virustiter im Lungengewebe bestimmt (Abb. 2 C). Die Protektion wurde als Reduktion im Virustiter gemessen im Vergleich zu Tieren ohne Serumtransfer.

Der passive Transfer von humanen MV-spezifischen Antikörpern schützte Baumwollratten vor intranasaler Infektion mit MV. In den ersten 3 Wochen nach Serumtransfer war der Schutz hoch signifikant ($p < 0,005$). Der Virustiter war zu mehr als 1,4 logarithmischen Stufen reduziert, was einer Virusreduktion von mehr als 95 % entspricht. 4 Wochen nach Serumtransfer war die Protektion nur noch schwach signifikant und der Virustiter war nur noch zu 0,6 logarithmischen Stufen reduziert. 7 Wochen nach Serumtransfer war keine Virusreduktion mehr nachweisbar. Das hohe Maß an Protektion in den ersten 3 Wochen nach Serumtransfer korrelierte mit der Präsenz von hohen Titern an MV-spezifischen und neutralisierenden Antikörpern in diesem Zeitraum. Wie beim Menschen sind auch in diesem heterologen Modellsystem für maternale Antikörper hohe Titer an MV-spezifischen Antikörpern (>120 mIU) protektiv.

Im Vergleich zu dem Modellsystem für natürliche maternale Antikörper bietet das alternative Modellsystem den Vorteil, daß die Gabe von Humanserum gut reproduzierbar ist, daß humane MV-spezifische Antikörper schneller abgebaut werden als natürliche maternale Antikörper und daß mit Hilfe des ELISA-Systems passiv transferierte humane Antikörper von aktiv induzierten Baumwollrattenantikörpern unterschieden werden können.

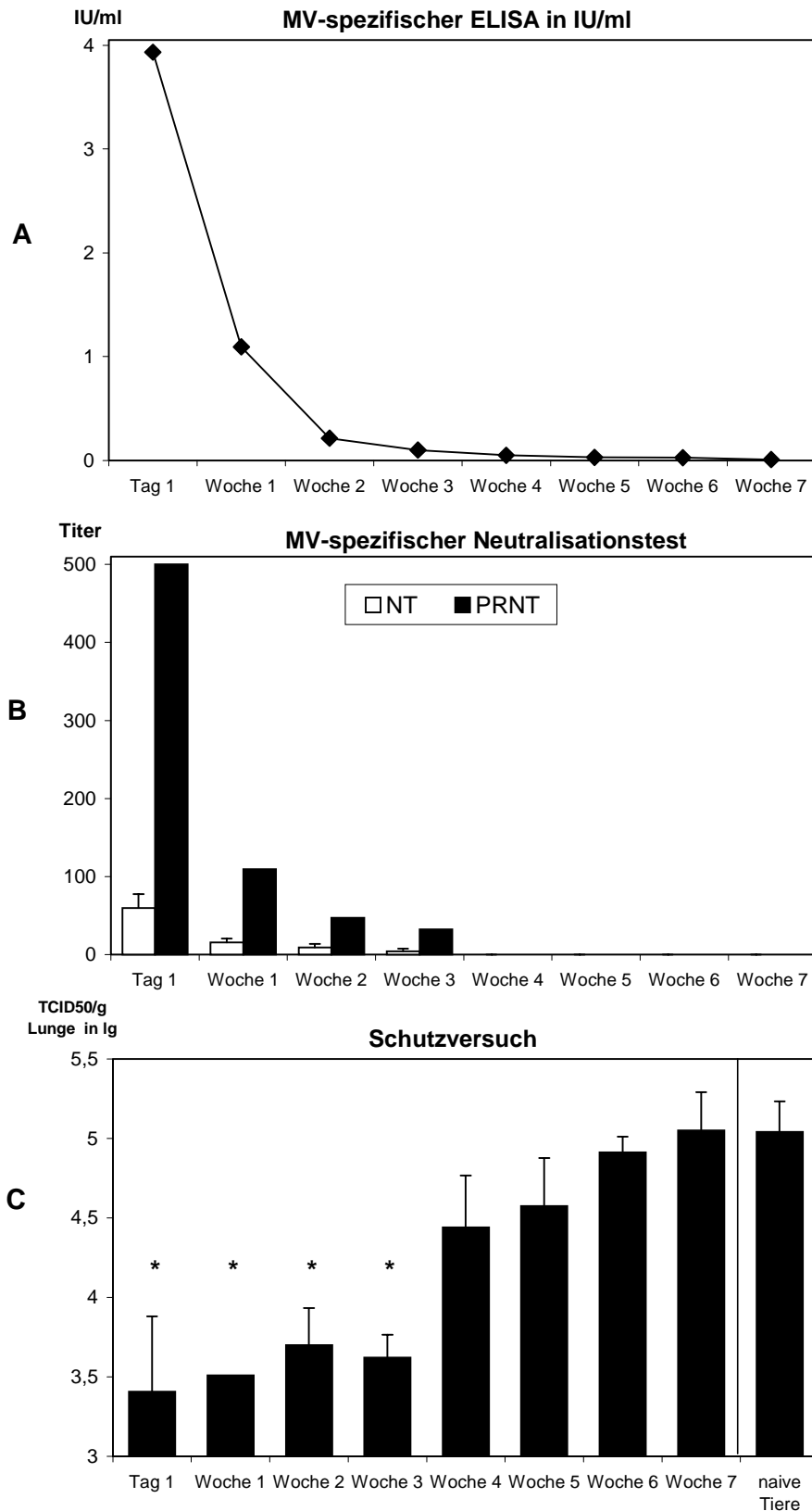


Abb.2: Passiver Transfer eines humanen MV-spezifischen Serums als Modell für maternale Antikörper. Nach intraperitonealer Injektion von 16 IU MV-spezifischer Antikörper wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Blut entnommen und der Titer an MV-spezifischen (A) und MV-neutralisierenden (B) Antikörpern bestimmt. Gleichzeitig wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert und der Virustiter im Lungengewebe bestimmt (C). Mit *-gekennzeichnete Virustiter sind hoch signifikant ($p < 0,005$) unterschiedlich zu Virustitern von naiven Tieren.

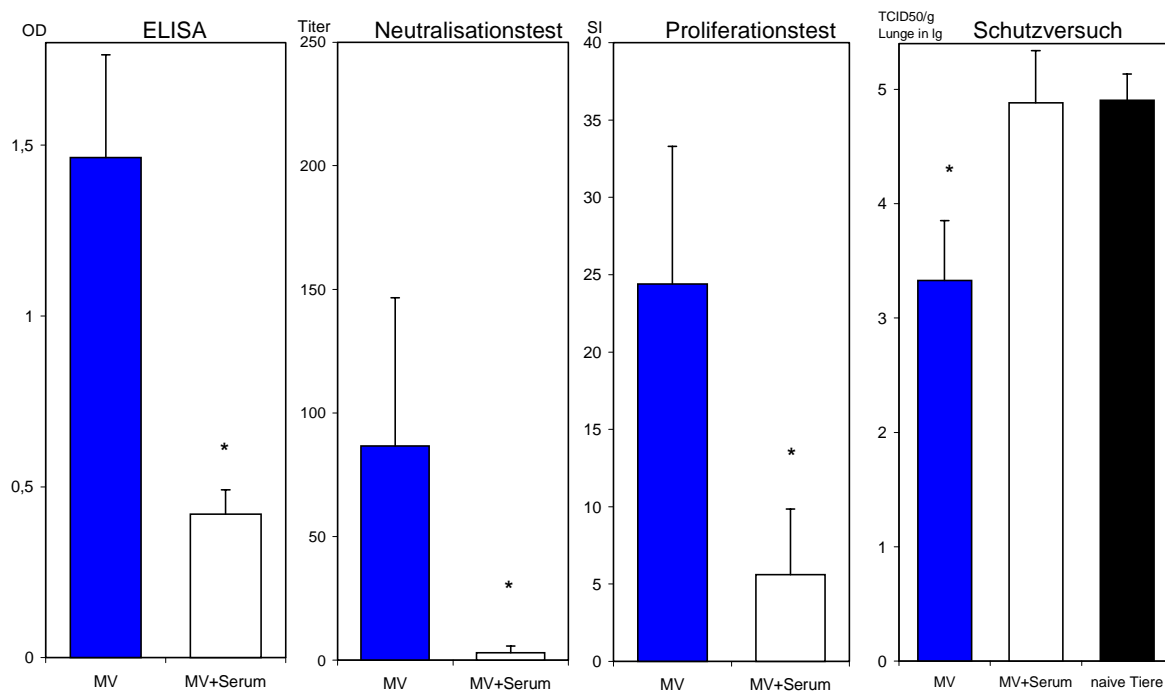
4.1.2.2. Passiver Transfer von humanen MV-spezifischen Antikörpern inhibiert die Vakzine-induzierte Serokonversion

Beim Menschen und bei der Baumwollratte wird die Vakzine-induzierte Serokonversion in Gegenwart maternaler Antikörper inhibiert. Um zu überprüfen, ob in dem heterologen Modellsystem für maternale Antikörper eine Immunisierung mit dem MV-Impfstoff ebenfalls inhibiert wird, wurden Baumwollratten nach Transfer von 1 ml Humanserum (16 IU) intraperitoneal mit 10^4 (Abb. 3A) bzw. 10^5 (Abb. 3B) PBE MV immunisiert. 7 Wochen nach der Immunisierung (nach vollständigem Abbau der humanen Antikörper) wurde den Tieren Blut entnommen und die Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern bestimmt. Anschließend wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert, nach 5 Tagen der Virustiter im Lungengewebe bestimmt und die MV-spezifische T-Zellproliferation ermittelt (Abb. 3 A und B).

Eine Immunisierung in Gegenwart humaner MV-spezifischer Antikörper führte zu einer hoch signifikant ($p < 0,003$) reduzierten Induktion von MV-spezifischen Antikörpern, im Vergleich zu Tieren ohne Serumtransfer. MV-neutralisierende Antikörper wurden in Gegenwart humaner MV-spezifischer Antikörper nicht induziert. Die MV-spezifische T-Zellproliferation *ex vivo* war im Vergleich zu Tieren ohne Serumtransfer auf 1/5 bzw. auf 1/10 reduziert. Als Resultat der Inhibition der Vakzine-induzierten Serokonversion und der reduzierten T-Zellproliferation waren Baumwollratten, die in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper immunisiert wurden, nicht vor intranasaler Infektion mit MV geschützt. Im Gegensatz dazu waren Baumwollratten, die in Abwesenheit humaner MV-spezifischer Antikörper mit 10^4 bzw. 10^5 PBE MV immunisiert wurden, hoch signifikant geschützt.

Die Effektivität der Immunisierung in Abwesenheit MV-spezifischer Antikörper wurde durch eine Erhöhung der Immunisierungsdosis verbessert. Eine Immunisierung mit 10^5 PBE MV induzierte eine stärkere Immunantwort als eine Immunisierung mit 10^4 PBE MV. Die Induktion MV-spezifischer bzw. MV-neutralisierender Antikörper, die Induktion der MV-spezifischen T-Zellantwort und die Protektion gegen eine respiratorische Infektion mit MV erhöhte sich. Im Gegensatz dazu spielte die verwendete Immunisierungsdosis in Gegenwart humaner MV-spezifischer Antikörper keine Rolle. Die Inhibition der Vakzine-induzierten Serokonversion war nach einer Immunisierung mit 10^4 bzw. 10^5 PBE MV identisch.

A: Immunisierung mit 10^4 PBE MV in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper



B: Immunisierung mit 10^5 PBE MV in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper

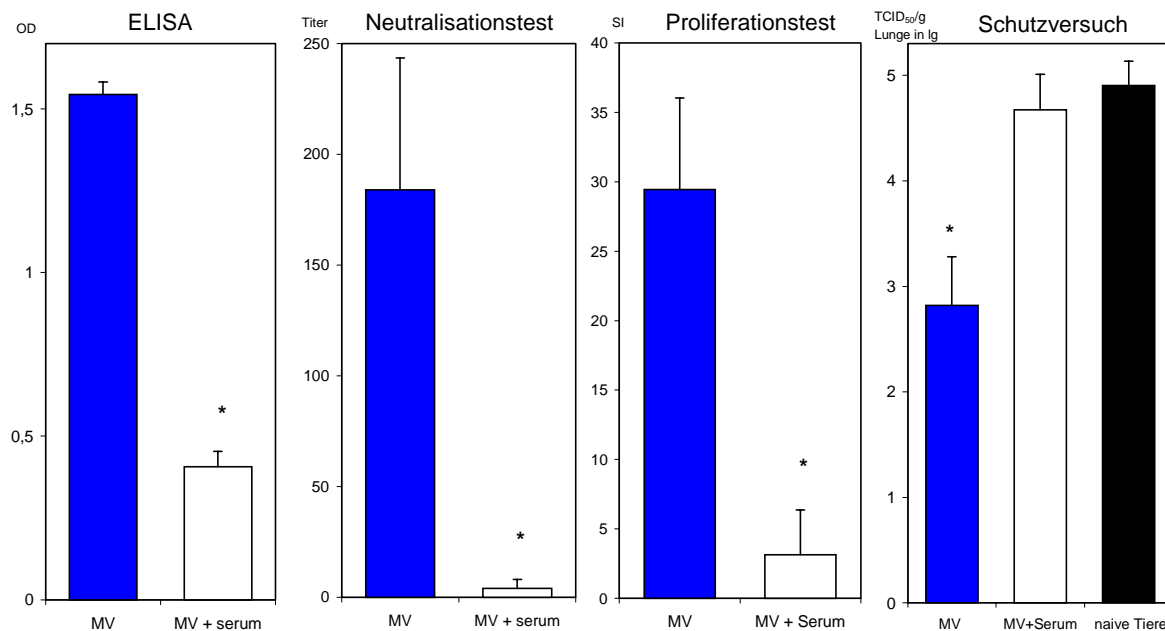
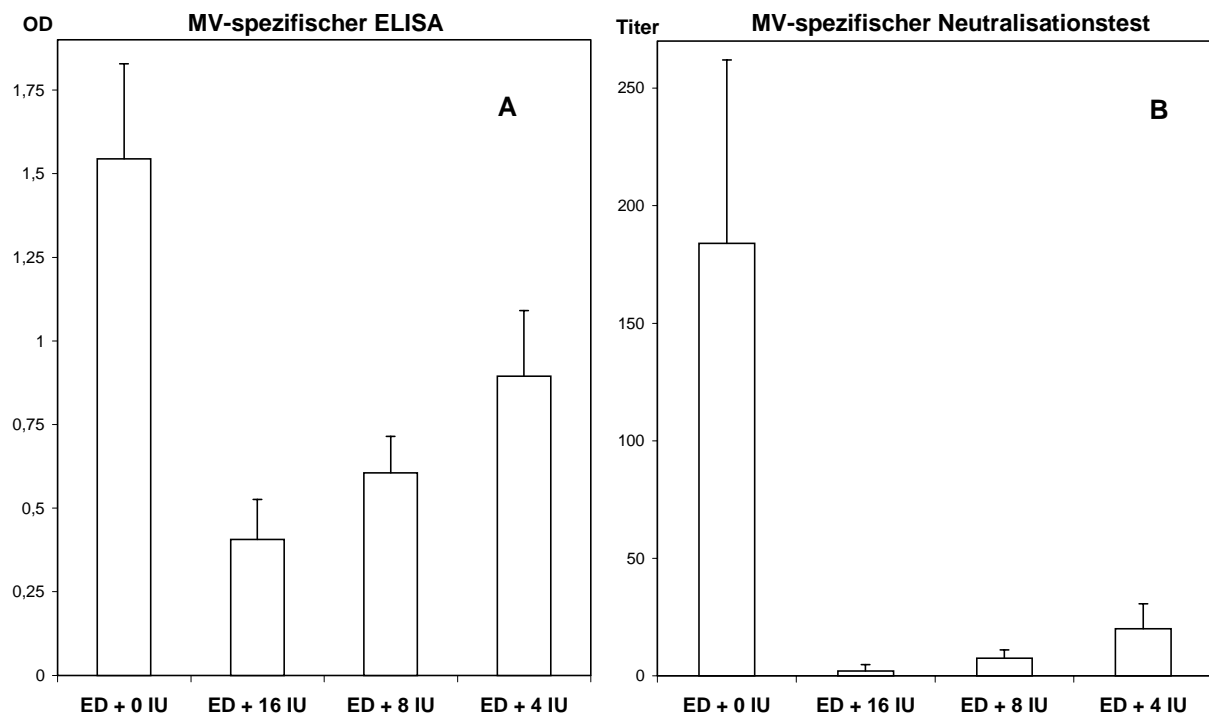


Abb. 3: Baumwollratten wurden intraperitoneal mit 10^4 PBE MV (A) bzw. mit 10^5 PBE MV (B) in An- oder Abwesenheit von 16 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert. 7 Wochen nach Immunisierung wurde den Tieren Blut entnommen und die Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern im ELISA und NT bestimmt. Anschließend wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert und 5 Tage später die MV-spezifische T-Zellproliferation und der Virustiter im Lungengewebe bestimmt. Mit *-gekennzeichnete Werte sind hoch signifikant ($p < 0,003$) reduziert.

4.1.2.3. Die Inhibition ist abhängig von der Konzentration an MV-spezifischen Antikörpern

Nach intraperitonealem Transfer von 16 IU MV-spezifischer Antikörper wurde die Immunisierung mit MV komplett inhibiert. Um die Frage zu untersuchen, wie sich ein niedrigerer Titer an MV-spezifischen Antikörpern auf eine Immunisierung mit MV auswirkt, wurden Baumwollratten intraperitoneal mit 10^5 PBE MV in Gegenwart von 16, 8 und 4 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert. Kontrolltiere wurden nur mit MV immunisiert, ohne vorhergehenden Serumtransfer (ED + 0 IU). 7 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurde die Vakzine-induzierte Serokonversion, die MV-spezifische T-Zellproliferation und der Schutz gegen eine respiratorische Infektion mit MV untersucht (Abb. 4).



Nach Immunisierung in Gegenwart von 16 bzw. 8 IU MV-spezifischer Antikörper war die Induktion MV-spezifischer Antikörper stark reduziert. MV-neutralisierende Antikörper wurden nicht induziert (NT < 10). Im Gegensatz dazu konnten nach Immunisierung in Gegenwart von 4 IU MV-neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (NT = 20) und die Titer an MV-spezifischen Antikörpern waren deutlich höher, als nach Immunisierung in Gegenwart von 16 bzw. 8 IU.

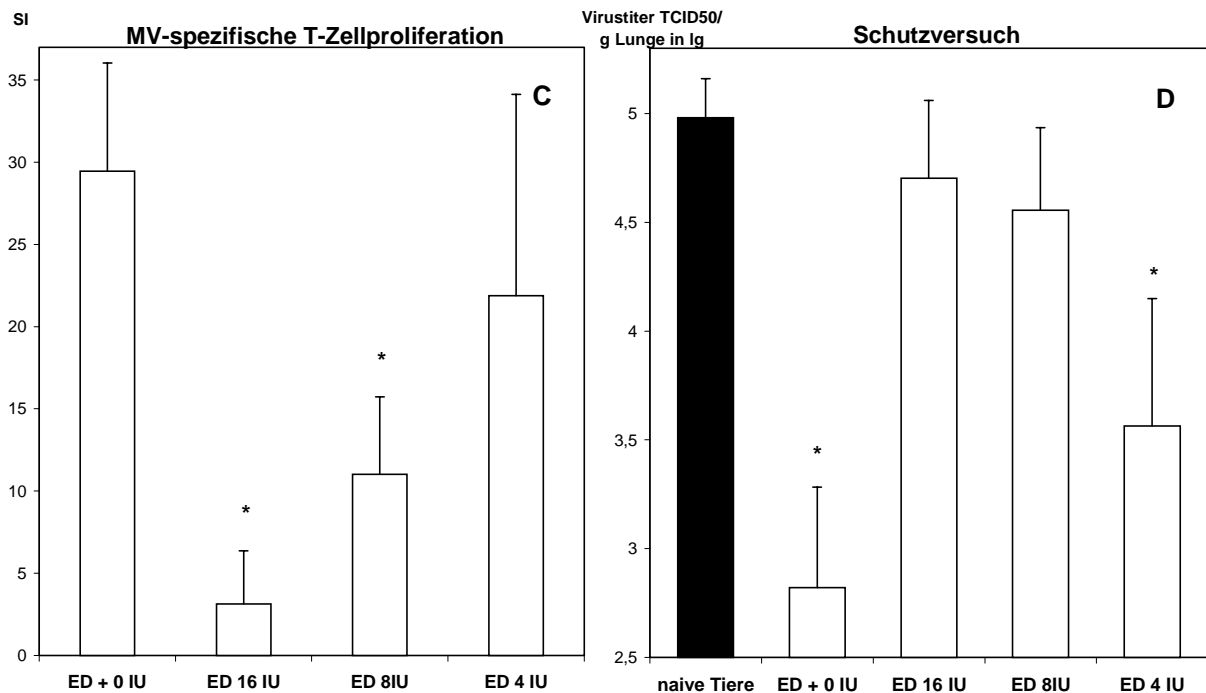


Abb. 4: Baumwollratten wurden intraperitoneal mit 10^5 PBE MV in Gegenwart von 0, 16, 8 und 4 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert. 7 Wochen nach Immunisierung wurde den Tieren Blut entnommen und der Titer an MV-spezifischen (A) und MV-neutralisierenden Antikörpern (B) bestimmt. Anschließend wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert und die MV-spezifische T-Zellproliferation (C) und die Protektion (D) bestimmt. Mit *-gekennzeichnete Werte sind statistisch hoch signifikant ($p < 0,004$) reduziert.

Eine Immunisierung in Gegenwart von 16 bzw. 8 IU MV-spezifischer Antikörper führte ebenfalls zu einer signifikant reduzierten MV-spezifischen T-Zellproliferation, während die T-Zellantwort nach Immunisierung in Gegenwart von 4 IU nicht signifikant unterschiedlich war im Vergleich zu Tieren, die in Abwesenheit von humanen MV-spezifischen Antikörpern immunisiert wurden. Als Konsequenz der Inhibition der Vakzine-induzierten Serokonversion und der verminderten T-Zellantwort nach Immunisierung in Gegenwart von 16 bzw. 8 IU, waren diese Tiere auch nicht gegen eine respiratorische Infektion mit MV geschützt, während Baumwollratten, die in Gegenwart von 4 IU immunisiert wurden, hoch signifikant geschützt waren.

In diesem Versuch wurde gezeigt, daß eine direkte Abhängigkeit zwischen der Konzentration an MV-spezifischen Antikörpern zum Zeitpunkt der Immunisierung und der Vakzine-induzierten Serokonversion bzw. Protektion besteht. Um zu gewährleisten, daß in diesem heterologen Modellsystem für maternale Antikörper eine Immunisierung mit MV vollständig inhibiert wird, wurde für die folgenden Immunisierungsversuche, in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper, jeweils 1ml Humanserum (16 IU MV-spezifische Antikörper) intraperitoneal injiziert.

4.1.2.4. Immunisierungsrouten, -dosis und -schema zeigen nur geringen Einfluß

Um den Einfluß der Immunisierungsdosis, aber auch der Immunisierungsrouten und des Applikationsschemas auf eine Immunisierung in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper zu untersuchen, wurden Baumwollratten mit unterschiedlichen Immunisierungsdosen intraperitoneal bzw. intranasal, in An- bzw. Abwesenheit MV-spezifischer Antikörper, einmal bzw. zweimal immunisiert (Tab. 2).

Eine intraperitoneale Immunisierung mit 10^4 bzw. 10^5 PBE MV wurde in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper vollständig inhibiert. Auch nach zweifacher intraperitonealer Immunisierung mit 10^6 PBE MV wurde die Vakzine-induzierte Serokonversion hoch signifikant inhibiert. Eine zweifache intranasale Immunisierung mit 10^6 PBE in Gegenwart humaner Antikörper wurde komplett inhibiert. Auch eine intranasale Immunisierung mit einer sehr hohen Immunisierungsdosis (2×10^7 PBE MV) wurde sehr stark inhibiert.

Daraus ergibt sich, daß eine Immunisierung in Gegenwart von 16 IU MV-spezifischer Antikörper unabhängig von der Immunisierungsdosis, der Immunisierungsrouten und dem Applikationsschema inhibiert wird.

Immunisierungsrouten Immunisierungsdosis	Immunisierung ohne/mit MV-spezifische Antikörper	ELISA (OD \pm SD)	NT (Titer \pm SD)	Anzahl der Versuchstiere
intraperitoneale Immunisierung 10^4 PBE MV 1x immunisiert	0 IU	1,5 \pm 0,3	87 \pm 60	4
	16 IU	0,4 \pm 0,1	< 10	4
intraperitoneale Immunisierung 10^5 PBE MV 1x immunisiert	0 IU	1,6 \pm 0,3	184 \pm 59	5
	16 IU	0,4 \pm 0,1	< 10	5
intraperitoneale Immunisierung 10^6 PBE MV, 2x im Wochenabstand	0 IU	1,8 \pm 0,1	360 \pm 145	5
	16 IU	0,7 \pm 0,3	23 \pm 30	5
intranasale Immunisierung 10^6 PBE MV, 2x im Wochenabstand	0 IU	1,5 \pm 0,2	80 \pm 55	5
	16 IU	0,4 \pm 0,1	< 10	5
intranasale Immunisierung 2×10^7 PBE MV 1x immunisiert	16 IU	0,6 \pm 0,1	< 10	3

Tab.2: Baumwollratten wurden mit unterschiedlichen Immunisierungsdosen, intraperitoneal bzw. intranasal, einmal bzw. zweimal immunisiert. 8 Wochen nach Immunierungsbeginn wurde den Tieren Blut entnommen und der Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern bestimmt. Die Immunisierungen in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper führten zu hoch signifikant ($p < 0,004$) reduzierten Titern an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern.

Mit dem passiven Transfer von 16 IU eines humanen MV-spezifischen Serums in Baumwollratten wurde ein Tiermodell für maternale Antikörper entwickelt, das der Situation im Menschen entspricht. In diesem Tiermodell kann neben der Immunogenität neuartiger MV-Impfstoffe auch die Protektion und die Effektivität in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper untersucht werden.

4.2. DNS-Vakzine

Eine neuartige Methode in der Impfstoffentwicklung ist die DNS-Vakzinierung. Da Plasmide nach Injektion das Immunisierungsantigen in ähnlicher Weise exprimieren, wie nach einer viralen Infektion, sich aber in eukaryontischen Zellen nicht vermehren können, sind sie eine sehr schonende und sichere Art der Immunisierung. Für Immunisierungsversuche in der Baumwollratte wurden die Plasmide pCGF₁, pCGH₅ und pSC-N verwendet, da diese Plasmide das Fusions-, das Hämagglutinin- und das Nukleokapsidprotein (MV-Hauptantigene) *in vitro* sehr gut exprimieren. Da pCGH₅ für das MV-Hämagglutinin (Hauptantigen für neutralisierende Antikörper) kodiert, kann mit diesem Plasmid der Immunisierungserfolg gut überprüft werden. Um die Methode der DNS-Immunisierung bei Baumwollratten zu etablieren und die Immunisierungsparameter zu optimieren, wurde aus diesem Grund das Plasmid pCGH₅ verwendet.

4.2.1. Intramuskuläre DNS-Immunisierung

Nach einer zweifachen intramuskulären DNS-Immunisierung mit 100µg pCGH₅ konnten 3 Wochen nach Immunisierungsbeginn noch keine MV-neutralisierenden und nur sehr niedrige Titer an MV-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Tab. 3 A). Die Titer an MV-spezifischen Antikörpern waren erst 9 Wochen nach Immunisierungsbeginn signifikant erhöht im Vergleich zum Präimmunserum. MV-neutralisierende Antikörper konnten zum ersten Mal 6 Wochen nach Immunisierungsbeginn nachgewiesen werden und erreichten einen Endtiter von 20 nach 9 Wochen. Damit konnte gezeigt werden, daß eine intramuskuläre Immunisierung mit 100 µg pCGH₅ eine MV-spezifische Immunantwort induziert.

Immunsisierung mit 100 µg pCGH5		Zeit nach Immunsisierung			Anzahl der Tiere
MV-spezifische Antikörper	Präimmunsierum (Titer ± SA)	3 Wochen (Titer ± SA)	6 Wochen (Titer ± SA)	9 Wochen (Titer ± SA)	
A					
ELISA i.m. Immunsisierung	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,15	0,5 ± 0,14	*0,6 ± 0,16	3
NT i.m. Immunsisierung	< 10	< 10	12,5 ± 10	20 ± 14	3
B					
ELISA i.d. Immunsisierung	0,2 ± 0,08	0,6 ± 0,19	*0,8 ± 0,12	*0,9 ± 0,11	3
NT i.d. Immunsisierung	< 10	*18 ± 3,5	*40 ± 21	*50 ± 21	3

Tab. 3: Baumwollratten wurden 2x intramuskulär (A) bzw. intradermal (B) im dreiwöchigen Abstand mit 100µg pCGH₅ immunsiziert. Nach 3, 6 und 9 Wochen wurde den Tieren Blut entnommen und die Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern bestimmt. Mit *-gekennzeichnete Werte sind statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Präimmunsierum.

4.2.2. Intradermale DNS-Immunsisierung

Aus experimentellen Systemen ist bekannt, daß eine intradermale DNS-Vakzinierung eine stärkere Immunantwort induziert als eine intramuskuläre Immunsisierung (Boyle, et al., 1997). Um die intradermale Immunsisierungsrouten zu untersuchen, wurden Baumwollratten zweimal im dreiwöchigen Abstand mit 100µg pCGH₅ intradermal immunsiziert (Tab. 3 B).

Auch bei Baumwollratten führte eine intradermale DNS-Immunsisierung zu einer schnelleren und stärkeren Induktion von MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern als eine intramuskuläre Immunsisierung. Drei Wochen nach Immunsierungsbeginn waren bereits MV-neutralisierende Antikörper nachweisbar, wohingegen nach intramuskulärer Immunsisierung noch keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden konnten. 9 Wochen nach Immunsierungsbeginn konnte ein Neutralisationstiter von 50 nachgewiesen werden, der im Vergleich zu einer intramuskulären Immunsisierung um den Faktor 2,5 erhöht war. Der Titer an MV-spezifischen Antikörpern war 9 Wochen nach intradermalen Immunsisierung im Vergleich zu einer intramuskulären Immunsisierung signifikant erhöht.

4.2.3. Optimierung der Immunisierungsparameter

Um die Effektivität einer intradermalen DNS-Vakzinierung zu verbessern wurde die optimale Immunisierungsdosis bestimmt und die immunstimulatorische Wirkung von bakterieller DNS überprüft. Hierzu wurden Baumwollratten mit unterschiedlichen Mengen an pCGH₅ immunisiert (Tab. 4).

	Menge an injizierter DNS		9 Wochen nach Immunisierung		Anzahl der Tiere
	pCGH ₅	pCDNA3	ELISA	Neutralisationstest	
	(exprimiert das MV-H)	(Stimulator DNS)	OD ± SD	Titer ± SD	
A	50 µg	0 µg	0,6 ± 0,07	18 ± 3	2
	100 µg	0 µg	0,9 ± 0,12	57 ± 25	2
	200 µg	0 µg	1,2 ± 0,01	160 ± 0	2
B	0 µg	200 µg	0,1 ± 0,12	0 ± 0	2
	50 µg	100 µg	1,0 ± 0,09	73 ± 11	2
	100 µg	100 µg	1,1 ± 0,03	80 ± 0	2
	150 µg	50 µg	1,2 ± 0,15	180 ± 100	4

Tab. 4: Bestimmung der optimalen Immunisierungsdosis und Überprüfen der immunstimulatorischen Wirkung von bakterieller DNS. A: Baumwollratten wurden 2x im dreiwöchigen Abstand mit den angegebenen Dosen an pCGH₅ intradermal immunisiert. B: zusätzlich zu unterschiedlichen Dosen an pCGH₅ wurden Baumwollratten mit pCDNA3 (Stimulator-DNS) intradermal immunisiert. 9 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurde den Tieren Blut entnommen und der Titer an MV-spezifischen/neutralisierenden Antikörpern bestimmt.

Mit Zunahme der Immunisierungsdosis stiegen sowohl die Titer an MV-spezifischen als auch an MV-neutralisierenden Antikörpern (Tab 4 A). Während nach Immunisierung mit 50µg pCGH₅ nur niedrige Antikörpertiter (OD = 0,6; NT = 18) induziert wurden, entwickelte sich nach Immunisierung mit 200 µg eine starke MV-spezifische Antwort (OD=1,2; NT=160). Der Antikörperanstieg war proportional zur Immunisierungsdosis. Der Titer von MV-neutralisierenden Antikörpern verdreifachte sich in etwa mit Verdopplung der Immunisierungsdosis. Um die immunstimulatorische Wirkung von bakterieller DNS zu überprüfen, wurden Baumwollratten mit unterschiedlichen Mengen an pCGH₅ immunisiert, bei gleichzeitiger Injektion von Stimulator-DNS. Als Stimulator-DNS wurde der Vektor pCDNA3 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) verwendet, da in diesem Plasmid 6 immunstimulatorische Sequenzen (CpG-Motive) enthalten sind. Eine Immunisierung mit 200 µg pCDNA3 alleine (Negativkontrolle) induzierte weder MV-spezifische noch MV-neutralisierende Antikörper (Tab. 4B). Im Gegensatz dazu führte bereits eine Immunisierung

mit 50 µg pCGH₅ + 100 µg pCDNA3 zu einer starken MV-spezifischen Immunantwort (OD = 1,0; NT = 73), die höhere Antikörpertiter induzierte, als nach Immunisierung mit der doppelten Dosis (100 µg) an pCGH₅ alleine (Tab 4 A und B). Eine Immunisierung mit 150 µg pCGH₅ + 50 µg pCDNA war auch effektiver, als eine Immunisierung mit 200 µg pCGH₅ alleine. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß die Verwendung von pCDNA3 als Adjuvans-DNS die Effektivität einer intradermalen Immunisierung mit pCGH₅ verbessert.

Bei diesen Immunisierungsversuchen betrug die optimale Immunisierungsdosis 150 µg spezifische DNS (pCGH₅), bei gleichzeitiger Injektion von 50 µg Adjuvans-DNS (pCDNA3). Die Tiere wurden jeweils zweimal im dreiwöchigen Abstand intradermal immunisiert. Für die folgenden DNS-Immunisierungen wurden Baumwollratten nach diesem optimierten Immunisierungsschema immunisiert.

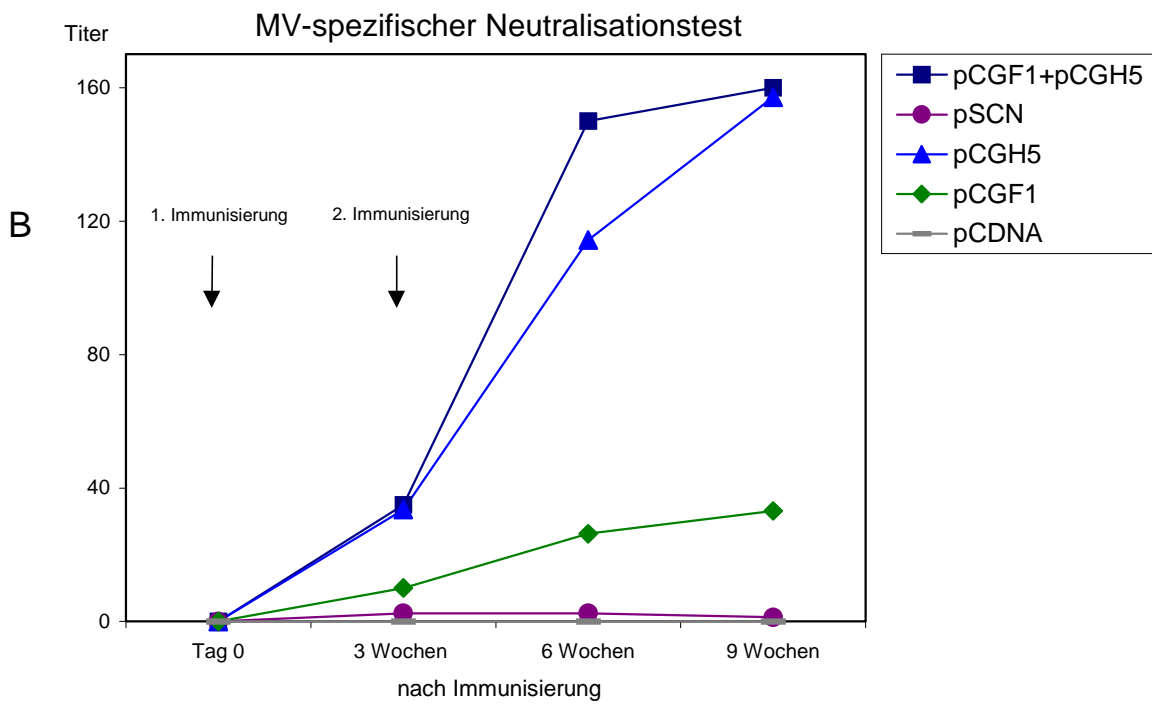
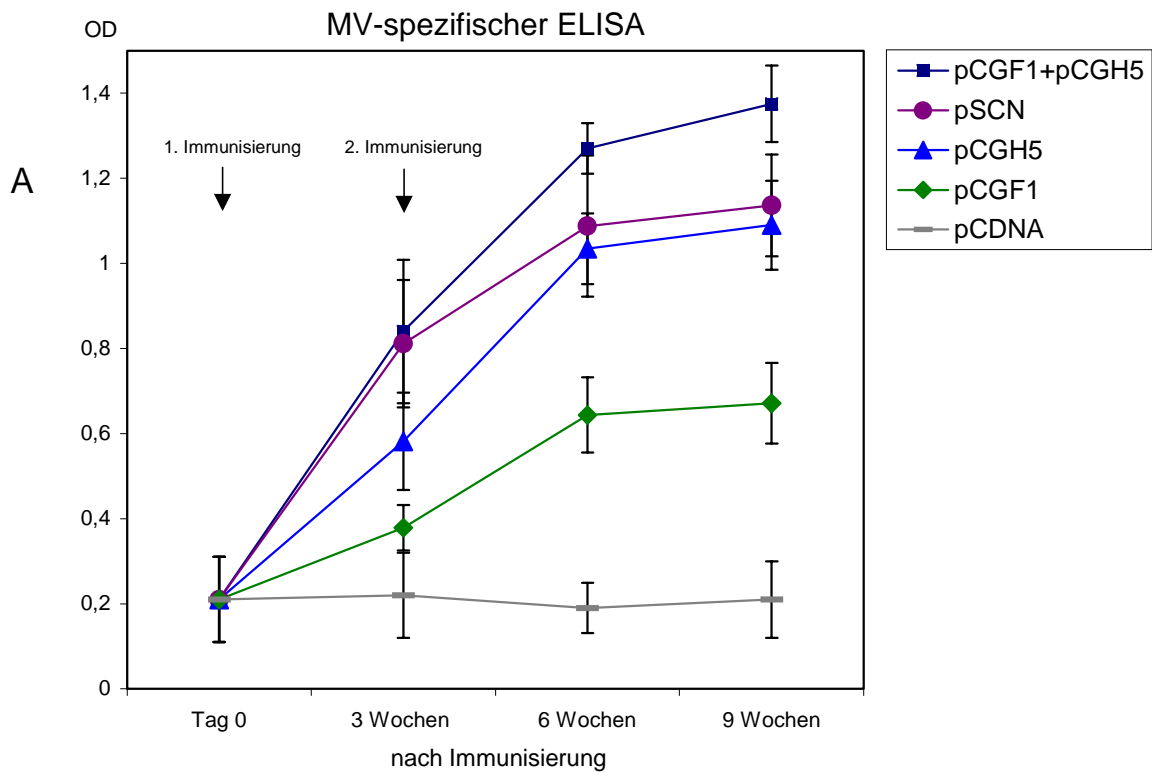
4.2.4. Vergleich der Immunogenität unterschiedlicher MV-Proteine (H, F und N)

Beim Menschen und im Affenmodell sind das MV-Hämagglutinin, -Fusions- und Nukleokapsidprotein die immunogensten Proteine des Masernvirus (Griffin, 1995). Immunisierungsstudien im Enzephalitismodell der Ratte (Bankamp, et al., 1991), (Brinckmann, et al., 1991) haben gezeigt, daß diese Antigene eine protektive Immunität gegen eine ZNS Infektion induzieren können.

Um sowohl die Immunogenität dieser MV-Proteine und als auch ihr protektives Potential in der Baumwollratte zu bestimmen, wurden Tiere mit pCGF₁ (exprimiert MV-F), mit pCGH₅ (exprimiert MV-H), mit pSC-N (exprimiert MV-N) und mit einer Mischung aus pCGF₁ + pCGH₅ immunisiert. Als Negativkontrolle wurden Tiere nur mit Stimulator-DNS (pCDNA3) immunisiert (Abb. 5).

Bei Baumwollratten, die nur mit pCDNA3 immunisiert wurden, konnten keine MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden (Abb.5 A und B). Im Gegensatz dazu induzierte die Immunisierung mit einer Mischung aus pCGF₁ + pCGH₅ die höchsten Titer an MV-spezifischen (OD = 1,4) und MV-neutralisierenden Antikörpern (NT = 160). Eine Immunisierung mit pSC-N führte zwar zu hohen Titern an MV-spezifischen Antikörpern, die das Masernvirus aber nicht neutralisieren konnten. Eine Plasmidimmunisierung mit pCGH₅ induzierte hingegen sowohl hohe Titer an MV-spezifischen (OD = 1.1) als auch an MV-neutralisierenden Antikörper (NT = 157). Im Vergleich dazu wurden nach Immunisierung mit pCGF₁ signifikant niedrigere Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern induziert.

9 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurden alle Tiere intranasal mit MV infiziert und 5 Tage später der Virustiter im Lungengewebe und die MV-spezifische T-Zellproliferation bestimmt (Abb. 5 C und D). Eine Immunisierung mit pSC-N und mit pCGF₁ induzierte eine starke T-Zellproliferation. Im Vergleich dazu induzierte pCGH₅ nur eine schwache T-Zellproliferation (Abb 5 C). Im Schutzversuch zeigte sich, daß eine Immunisierung mit pCGF₁, pCGH₅ und mit einer Mischung aus pCGF₁ + pCGH₅ eine hoch signifikante ($p < 0,0002$) Protektion (Virustiter zu mehr als 1,9 logarithmische Stufen reduziert) induzierte (Abb. 5D). Die stärkste Reduktion im Virustiter wurde nach Immunisierung mit pCGF₁, bzw. nach Immunisierung mit einer Mischung aus pCGF₁ + pCGH₅ gefunden. pCGH₅ induzierte eine geringfügig niedrigere Protektion, die aber nicht signifikant unterschiedlich war im Vergleich zu Immunisierung mit pCGF₁ bzw. zu einer Kombinationsimmunisierung aus pCGF₁ + pCGH₅. Im Gegensatz dazu führte eine Immunisierung mit pSC-N trotz der Induktion von MV-spezifischen Antikörpern und einer MV-spezifischen T-Zellproliferation nicht zu Schutz vor intranasaler Infektion mit MV. In diesem Immunisierungsversuch konnte gezeigt werden, daß die MV-Proteine F, H und N immunogen sind. Aber nur die beiden Glykoproteine (das Fusionsprotein und das Hämagglutinin) induzierten MV-neutralisierende Antikörper und Schutz vor einer MV-Infektion.



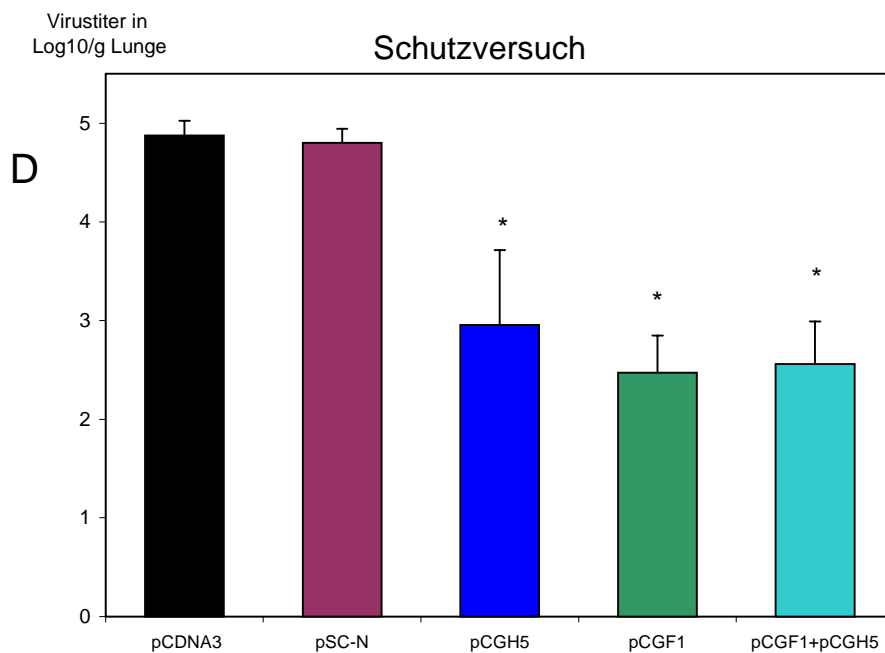
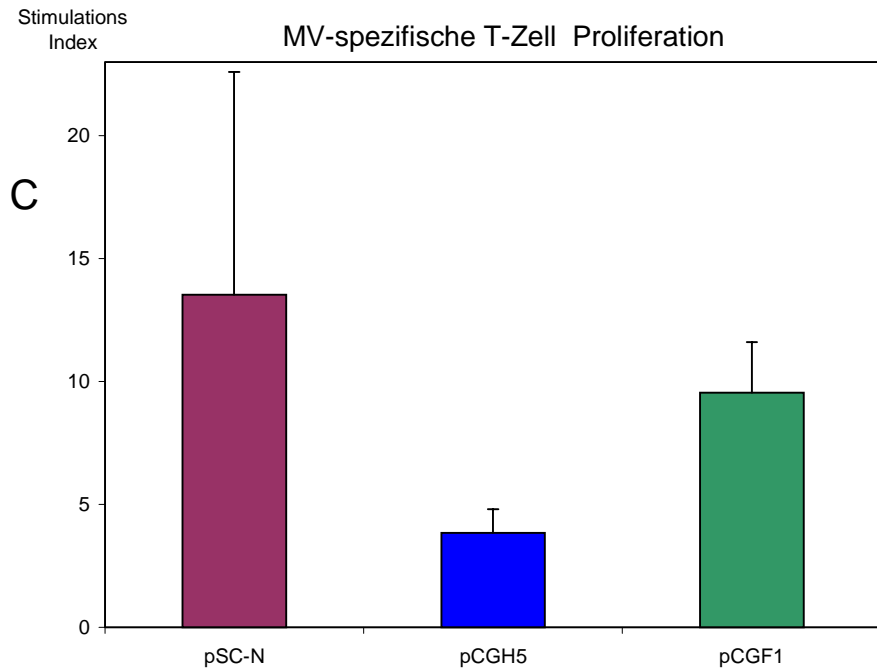


Abb. 5.: Baumwollratten wurden 2x im dreiwöchigen Abstand mit 150µg pCGF1, pCGH5, pSC-N bzw. mit einer Mischung aus pCGF1 + pCGH5, plus 50µg pCDNA3 (Stimulator-DNS) intradermal immunisiert. Nach 3, 6 und 9 Wochen wurde den Tieren Blut entnommen und der Titer an MV-spezifischen (A) und MV-neutralisierenden (B) Antikörpern bestimmt. Anschließend wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert und 5 Tage später die MV-spezifische T-Zellproliferation (C) und der Virustiter im Lungengewebe (D) bestimmt. Mit *-gekennzeichnete Virustiter sind hoch signifikant ($p < 0,004$) unterschiedlich im Vergleich zu Titern von Tieren, die mit pCDNA3 (Negativkontrolle) immunisiert wurden.

4.2.5. Histologische Untersuchung des Lungengewebes immunisierter Baumwollratten

Um den Immunisierungserfolg einer DNS-Immunisierung bei Baumwollratten näher zu definieren, wurde neben der Virusreduktion auch histologische Veränderungen in der Lunge als zusätzlicher Protektionsparameter untersucht.

Die WHO fordert, daß alternative Masernvakzinen sowohl das MV-Hämagglutinin als auch das MV-Fusionsprotein exprimieren sollen, um die Entstehung von atypischen Masern nach Impfung zu verhindern. Deshalb wurde untersucht, inwieweit sich eine Immunisierung mit pCGF₁ bzw. mit pCGH₅ alleine von einer gleichzeitigen Immunisierung mit beiden Plasmiden (pCGH₅ + pCGF₁) unterscheidet. (Abb. 6).

Naive Baumwollratten entwickeln nach intranasaler Infektion mit MV eine interstitielle Pneumonie mit nekrotischen Läsionen, wie sie teilweise auch im Menschen auftritt (Niewiesk und Germann, 2000). Nach Immunisierung mit einer Mischung aus pCGH₅ + pCGF₁ und einer anschließenden intranasalen Infektion mit MV, konnten nur geringgradige histologische Veränderungen in der Lunge festgestellt werden. Diese Tiere entwickelten nur teilweise eine geringgradige, fokale Peribronchitis (Grad 1) (Abb. 6 A). Eine ebenfalls nur milde Peribronchitis (Grad 1) konnte bei Baumwollratten nachgewiesen werden, die nur mit pCGH₅ immunisiert wurden (Abb. 6 B). Bei Tieren, die nur mit pCGF₁ immunisiert wurden, konnte eine ausgeprägtere Peribronchitis (Grad 2) mit starker Histiozytose und mit Infiltration von neutrophilen Granulozyten (Abb. 6 C) nachgewiesen werden.

Vergleicht man die Induktion MV-spezifischer/neutralisierender Antikörper, die Induktion einer MV-spezifischen T-Zellproliferation, die Virusreduktion und die Lungenpathologie, dann bestätigte sich, daß eine Immunisierung mit einer Mischung aus pCGH₅ + pCGF₁ am effektivsten war.

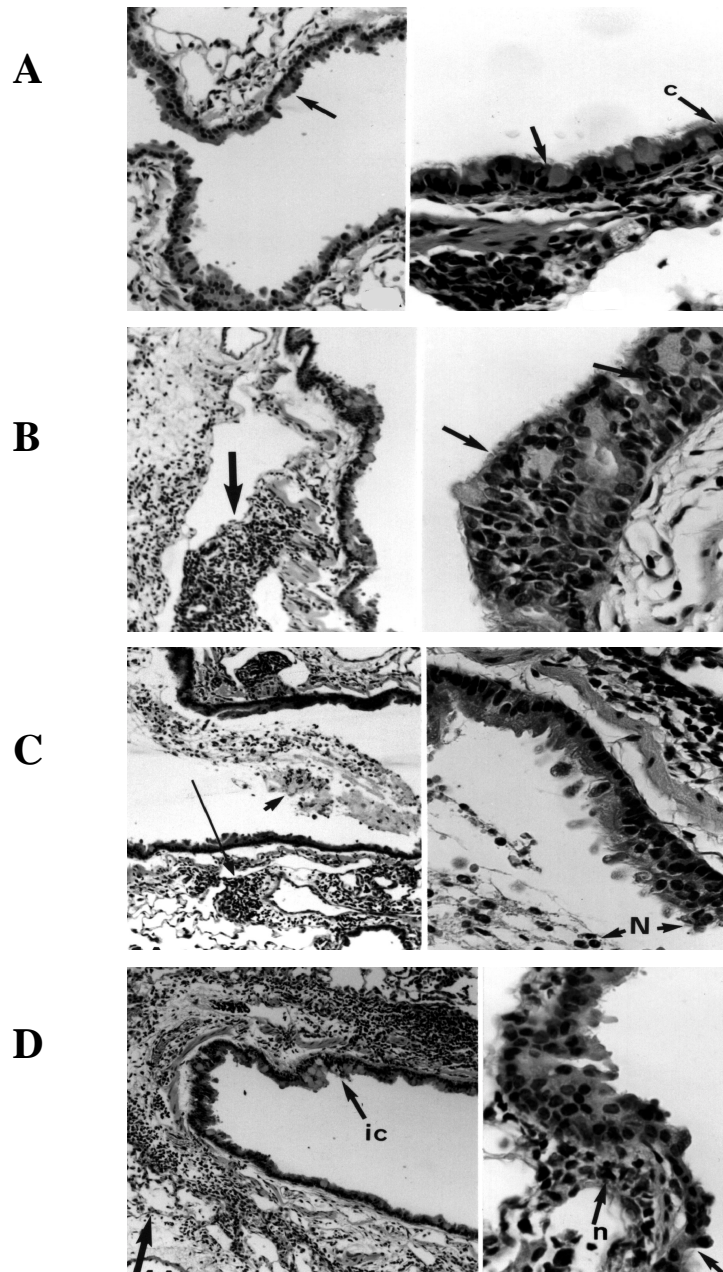


Abb. 6.: Baumwollratten wurden 2x im dreiwöchigen Abstand mit 150 μ g pCGF₁, pCGH₅ bzw. mit einer Mischung aus pCGF₁ + pCGH₅, plus 50 μ g pCDNA3 (Stimulator-DNS) intradermal immunisiert. 9 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert und 5 Tage später die Lunge histologisch untersucht (H&E-Färbung). Die Abbildungen auf der rechten Seite zeigen einen vergrößerten Bildausschnitt der mit Pfeilen markierten Region in den linken Bildern.

A: Gleichzeitige Immunisierung mit pCGH₅ + pCGF₁: sehr milde Peribronchitis, nur eine einzige intraepitheliare Infiltration von Granulozyten, ansonsten unauffälliges Lungenepithel mit intakten Flimmerepithel (C).

B: Immunisierung mit pCGH₅ alleine: milde Peribronchitis, nur vereinzelt intraepitheliare Infiltration von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten (Pfeile).

C: Immunisierung mit pCGF₁ alleine: stärkere Peribronchitis mit intraepitheliarer und intraluminarer Infiltration von neutrophilen Granulozyten (N).

D: Immunisierung mit pCGH₅ in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper (16 IU): Starke Peribronchitis mit intraepitheliale Vorliegen von inflammatorischen Zellen (ic), starke Infiltration neutrophiler Granulozyten (n).

4.2.6. DNS-Immunisierung in Gegenwart MV-spezifischer („maternaler“) Antikörper

Das Ziel bei der Entwicklung eines neuartigen MV-Impfstoffs ist es, daß dieser Impfstoff im Gegensatz zum derzeitigen MV-Impfstoff in Gegenwart maternaler Antikörper neutralisierende Antikörper und Schutz induziert. Laut Literatur konnte in anderen experimentellen Systemen mit Hilfe der DNS-Vakzinierung in Gegenwart maternaler Antikörper eine protektive Immunantwort induziert werden (Hasset, et al., 1997). Um die Effektivität einer Plasmid-Vakzinierung in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper in Baumwollratten zu untersuchen, wurden Tiere mit pCGH₅ und mit pSC-N in An- bzw. Abwesenheit von 16 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert (Abb. 7).

Eine Immunisierung mit pCGH₅ bzw. mit pSC-N in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper induzierte keine MV-neutralisierenden Antikörper (Abb. 7 B). Es konnten nur niedrige Titer an MV-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, die aber nicht signifikant erhöht waren im Vergleich zu Tieren, die mit pCDNA3 (Negativkontrolle) immunisiert wurden (Abb. 7 A). 9 Wochen nach Immunisierungsbeginn (nach vollständigem Abbau der passiv transferierten humanen MV-spezifischen Antikörper) wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert und der Virustiter in der Lunge bestimmt. Im Schutzversuch konnte bestätigt werden, daß nur Baumwollratten, die in Abwesenheit MV-spezifischer Antikörper mit pCGH₅ immunisiert wurden, hoch signifikant vor intranasaler Infektion mit MV geschützt waren (Virusreduktion um mehr als 1,9 logarithmische Stufen) (Abb. 7 C). Eine Immunisierung mit pCGH₅ oder pSC-N in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper führte nicht zu Schutz gegen eine respiratorische Infektion mit MV. In diesem Versuch konnte nochmals gezeigt werden, daß das Nukleokapsidprotein kein protektives Antigen in der Baumwollratte ist.

In der histologischen Untersuchung des Lungengewebes konnte bestätigt werden, daß eine Immunisierung mit pCGH₅ in Abwesenheit MV-spezifischer Antikörper nur geringe histologische Veränderungen induzierte. Eine Immunisierung in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper hingegen führte zu ausgeprägten histologischen Veränderungen. Bei diesen Tieren konnte eine ausgeprägte Peribronchitis (Grad 3) nachgewiesen werden. Intraepithelial waren inflammatorische Zellen (i.c.) nachweisbar und es kam zu einer starken Infiltration von neutrophilen Granulozyten (Fig 6 D). Das bedeutet, daß im Baumwollrattenmodell eine DNS-Vakzinierung (mit Plasmiden, die sowohl für ein internes als auch für ein Oberflächenglykoprotein kodieren) in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper nicht in der Lage ist, neutralisierende Antikörper und Schutz zu induzieren.

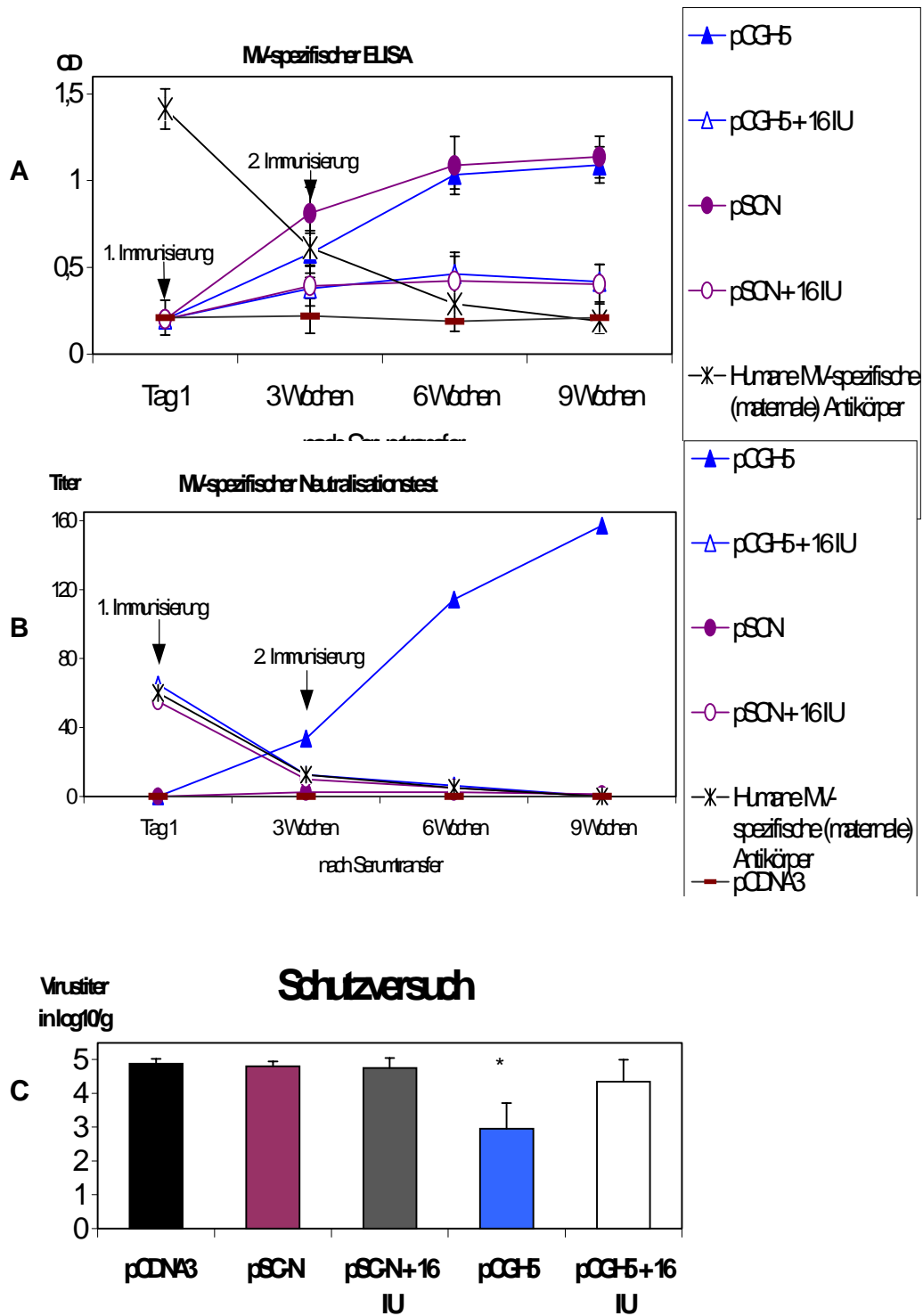


Abb.7.: Immunisierung in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper

Baumwollratten wurden 2x im dreiwöchigen Abstand mit 150 μ g pCGH₅ bzw. pSC-N plus 50 μ g pCDNA3 in An- bzw. Abwesenheit MV-spezifischer Antikörper intradermal immunisiert. Nach 3, 6 und 9 Wochen wurde den Tieren Blut entnommen, der Titer an MV-spezifischen humanen bzw. Baumwollratten-Antikörpern (A) und der Titer an MV-neutralisierenden Antikörpern (B) bestimmt. 9 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert und 5 Tage später der Virustiter in der Lunge bestimmt (C). Mit *-gekennzeichnete Virustiter sind signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Virustitern von Tieren, die mit pCDNA3 immunisiert wurden.

4.3. VSV als Immunisierungsvektor

Um neutralisierende Antikörper in Gegenwart von maternalen Antikörpern zu induzieren, wurde ein rekombinantes vesikuläres Stomatitisvirus (VSV) als Impfvektor getestet, welches das MV-Hämagglutinin exprimiert (VSV-H). Dieses rekombinante Virus wurde in der Arbeitsgruppe von John K. Rose (Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut) hergestellt (Schnell, et al., 1996). Durch VSV Infektion werden sehr schnell neutralisierende Antikörper gegen das VSV-Glykoprotein G induziert. In dem rekombinanten VSV-H ist das MV-H in die Hülle von VSV inkorporiert und macht ein Viertel der Hüllproteine aus. Aus diesem Grund sollte VSV-H auch hohe Titer an MV-neutralisierenden Antikörpern induzieren, zumal bereits gezeigt werden konnte, daß ein rekombinantes VSV, welches ein Hämagglutinin von Influenza A Virus exprimiert, hohe Titer an Influenza-neutralisierenden Antikörpern induzieren konnte (Roberts, et al., 1998).

4.3.1. Pathogenität von VSV bzw. VSV-H im Tiermodell

Im Mausmodell für VSV-Infektionen (Forger, et al., 1991) sterben empfängliche Mäuse nach intranasaler Infektion mit VSV titerabhängig an einer Enzephalitis. Um die Pathogenität von VSV in Baumwollratten zu untersuchen, wurden Tiere intraperitoneal bzw. intranasal mit VSV-Wildtyp (Serotyp Indiana (VSV-Indiana)) bzw. mit VSV-H infiziert und täglich der Gewichtsverlauf kontrolliert. Nach intraperitonealer Infektion, auch mit hohen Infektionsdosen (10^7 PBE) an VSV-Indiana bzw. VSV-H konnten keine klinischen Symptome festgestellt werden und die Tiere nahmen kontinuierlich an Gewicht zu.

Baumwollratten, die intranasal mit 10^4 PBE VSV-Indiana infiziert wurden, wurden 3 bzw. 4 Tage nach Infektion moribund und mußten daraufhin getötet werden (Abb 8). Eine intranasale Infektion mit 10^3 PBE VSV-Indiana verlief klinisch unauffällig, lediglich die Gewichtszunahme war am 5. und 6. Tag nach Infektion geringfügig reduziert. Tiere, die mit 10^2 PBE VSV-Indiana infiziert wurden, zeigten weder klinische Symptome, noch Abnormitäten in der Gewichtszunahme. Eine intranasale Infektion mit VSV-H verlief klinisch unauffällig. Selbst sehr hohe Infektionsdosen (5×10^7 PBE) führten nicht zu Gewichtsverlust oder zum Auftreten von klinischen Symptomen (Abb. 8). Daraus ergibt sich, daß VSV-H im Vergleich zu VSV-Indiana drastisch attenuiert ist (um mehr als 3,5 logarithmische Stufen). Diese enorme Attenuierung von VSV-H bei Baumwollratten liegt nicht an der zusätzlichen Inkorporation des MV-Hämagglutinins in der Hülle von VSV. Diese Attenuation muß während der Konstruktionsphase von VSV-H aus Plasmid-DNS stattgefunden haben. Ein rekombinanter VSV-Wildtyp (VSV-WT_{rek}), der auf Basis von VSV-Indiana aus Plasmid-DNS

konstruiert wurde, ist ebenfalls hochgradig attenuiert. Dieser rekombinante Wildtyp diente als Ausgangsbasis für die Konstruktion von VSV-H.

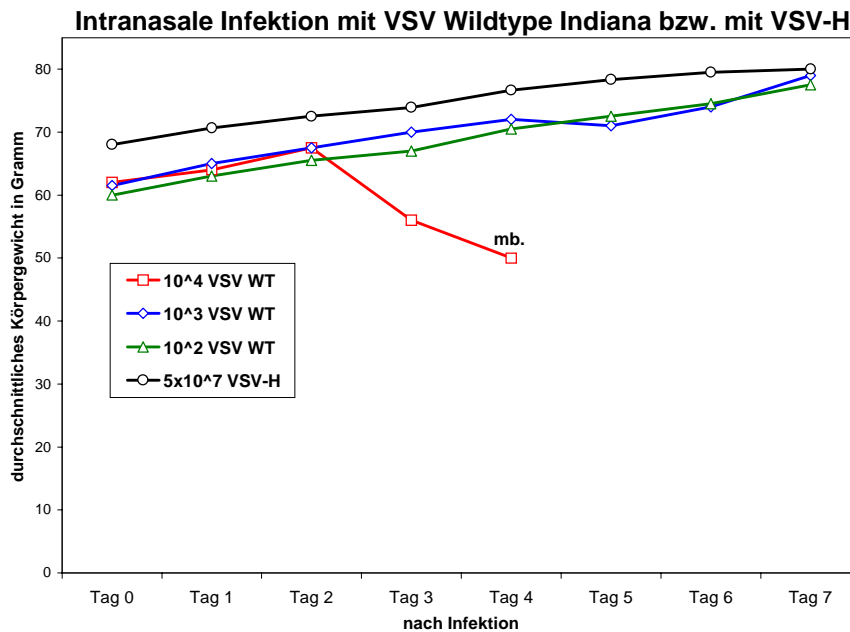


Abb.8: Baumwollratten wurden intranasal mit den angegebenen Dosen an VSV-Indiana bzw. VSV-H infiziert und die Gewichtszunahme an den folgenden Tagen nach Infektion überprüft. mb.= moribund.

4.3.1.1. *In vivo* Replikation von VSV-H

VSV-H ist in Baumwollratten drastisch attenuiert, aber noch infektiös und replikationsfähig. Um den Replikationsort von VSV-H *in vivo* zu untersuchen, wurden Baumwollratten intraperitoneal bzw. intranasal mit VSV-H infiziert. Anschließend wurde der Virustiter in verschiedenen Organen bestimmt. Nach intraperitonealer Infektion konnte kein Virus aus der Leber, Lunge, Milz, Niere und Gehirn nachgewiesen werden. Nach intranasaler Infektion konnte VSV-H in der Lunge und im Gehirn von infizierten Tieren nachgewiesen werden (Abb. 9).

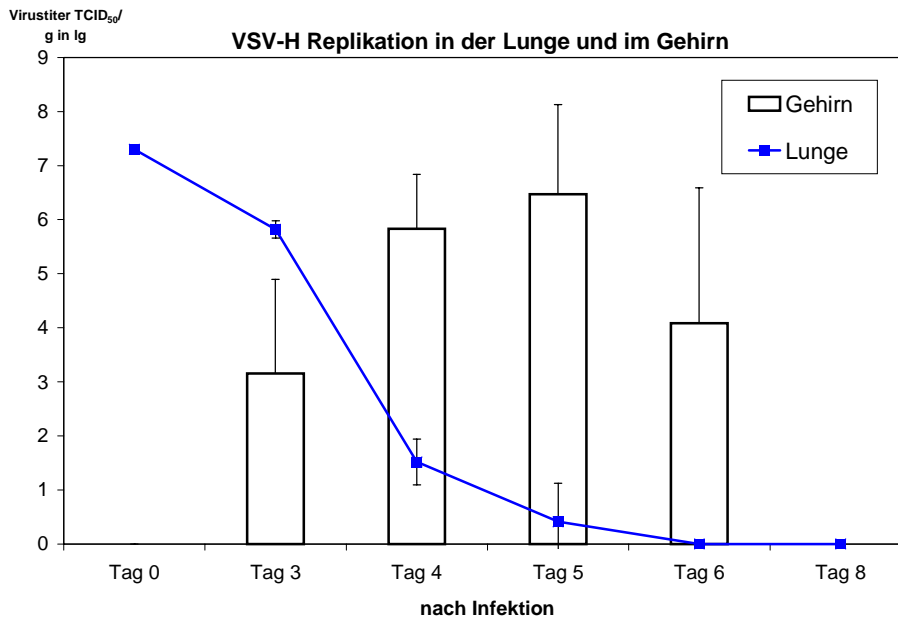


Abb. 9.: Baumwollratten wurden intranasal mit 2×10^7 PBE VSV-H infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten der Virustiter in der Lunge und im Gehirn bestimmt.

In der Lunge konnte in den ersten 5 Tagen nach intranasaler Infektion eine abortive Replikation von VSV-H nachgewiesen werden. Im Gehirn replizierte VSV-H für 6 Tage, mit höchsten Titern nach 5 Tagen. Die intrazerebrale Replikation von VSV-H ist abhängig von der Infektionsdosis. Nach intranasaler Infektion mit 5×10^5 PBE konnten nur niedrige Titer ($\text{TCID}_{50} = 10^{2,9 \pm 1,6}$) an VSV-H im Gehirn nachgewiesen werden, während nach Infektion mit 2×10^7 PBE sehr hohe Titer ($\text{TCID}_{50} = 10^{6,5 \pm 1,0}$) nachgewiesen werden konnten, ohne daß die Tiere moribund wurden. Das bedeutet, daß VSV-H zwar drastisch attenuiert ist, aber immer noch einen ausgeprägten Neurotropismus aufweist.

4.3.2. Immunogenität von VSV-H in Baumwollratten

Um die Effektivität von VSV-H als Immunisierungsvektor zu untersuchen, wurden Baumwollratten intranasal bzw. intraperitoneal mit VSV-H immunisiert. Als Negativkontrolle wurden Tiere mit dem rekombinanten VSV-WT_{rek} immunisiert (Abb. 10). Baumwollratten, die mit VSV-WT_{rek} immunisiert wurden, entwickelten keine MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörper. Im Gegensatz dazu induzierte VSV-H sowohl nach intranasaler als auch nach intraperitonealer Immunisierung eine starke MV-spezifische Immunantwort. Hierbei wurden sowohl hohe Titer an MV-spezifischen als auch an MV-neutralisierenden Antikörpern gebildet und es konnte kein Unterschied zwischen einer intranasalen und intraperitonealen Immunisierung festgestellt werden.

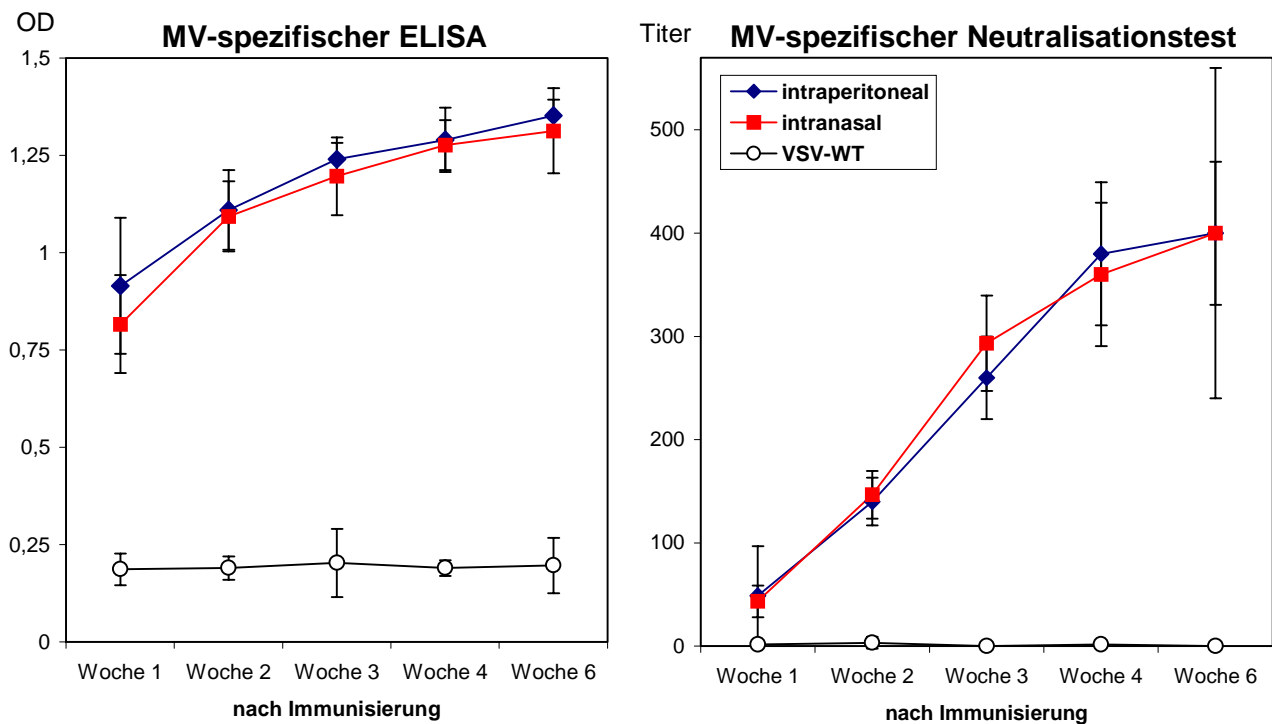


Abb. 10.: Baumwollratten wurden intraperitoneal bzw. intranasal mit 2×10^7 PBE VSV-H bzw. mit VSV-WT_{rek} immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut entnommen und Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern bestimmt.

4.3.2.1. Antikörpertiter sind abhängig von der Immunisierungsdosis

Um den Einfluß der Immunisierungsdosis auf die Induktion von MV-spezifischen Antikörpern zu untersuchen, wurden Baumwollratten mit 1×10^4 , 5×10^6 , 2×10^7 und 5×10^7 PBE VSV-H immunisiert (Tab. 5.).

Hierbei zeigte sich, daß bereits eine einmalige Immunisierung mit 1×10^4 PBE VSV-H ausreicht, um hohe Titer an MV-spezifischen Antikörpern (OD = 0,98; NT = 266) zu induzieren. Mit Zunahme der Immunisierungsdosis (5×10^7 PBE) erhöhte sich auch die Induktion von MV-spezifischen Antikörpern (OD = 1,31; NT = 520). Bei Baumwollratten, die hingegen mit hohen Dosen (5×10^7 PBE) an VSV-WT_{rek} immunisiert wurden, konnten keine MV-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

Der Grad der Serokonversion ist abhängig von der Immunisierungsdosis

Immuisierungsdosis	4 Wochen nach Immunisierung		Tierzahl
	ELISA (OD ± SA)	NT (NT ± SA)	
1x10 ⁴ PBE VSV-H	0,98 ± 0,08	266 ± 46	3
5x10 ⁶ PBE VSV-H	1,18 ± 0,12	293 ± 69	3
2x10 ⁷ PBE VSV-H	1,27 ± 0,06	410 ± 69	3
5x10 ⁷ PBE VSV-H	1,31 ± 0,11	520 ± 109	3
5x10 ⁷ PBE VSV-WT	0,21 ± 0,05	< 10	3

Tab.5.: Baumwollratten wurden 1x mit den angegebenen Dosen an VSV-H intranasal immunisiert. Als Kontrolle wurden Tiere mit VSV-WT immunisiert. 4 Wochen später wurde den Tieren Blut entnommen und die Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern im ELISA und NT bestimmt.

4.3.2.2. Direkter Vergleich zwischen VSV-H und MV

Die Effektivität eines neuartigen MV-Impfstoffs sollte mindestens so hoch sein, wie die des derzeitig verwendeten Impfstoffes bzw. diese noch übertreffen. Um VSV-H mit MV zu vergleichen, wurden Baumwollratten zweimal im vierwöchigen Abstand intranasal und intraperitoneal mit 5×10^6 PBE VSV-H bzw. MV immunisiert, die Kinetik der MV-spezifischen Antikörpersynthese untersucht und die Protektion bestimmt (Abb. 11).

Eine Immunisierung mit VSV-H (intranasal oder intraperitoneal) induzierte in den ersten 4 Wochen (vor der 2. Immunisierung) höhere Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern als eine intranasale bzw. intraperitoneale Immunisierung mit MV (Abb. 11 A und B). Dieser Unterschied war nach intranasaler Immunisierung hoch signifikant ($p < 0,003$). Erst nach einer zweifachen intraperitonealen Immunisierung mit MV wurden hohe Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern induziert, während auch nach zweifacher intranasaler Immunisierung mit MV nur niedrige Titer induziert wurden.

Beide Immunisierungsvektoren induzierten nach intraperitonealer und nach intranasaler Immunisierung einen hoch signifikanten Schutz ($p < 0,002$; Virusreduktion um mehr als 1,3 logarithmische Stufen) vor einer respiratorischen Infektion mit MV. Der Schutz war in den unterschiedlichen Gruppen nahezu äquivalent, nur Tiere, die intranasal mit MV immunisiert wurden, zeigten geringfügig verminderte Protektion, die aber nicht signifikant niedriger war (Abb. 11 C).

Im direkten Vergleich zwischen VSV-H und MV wurde ersichtlich, daß VSV-H effektiver ist als MV. Bereits nach einmaliger Immunisierung mit VSV-H, besonders über die intranasale Immunisierungsrouten, induzierte VSV-H sehr hohe Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern, die signifikant höher waren als nach Immunisierung mit MV.

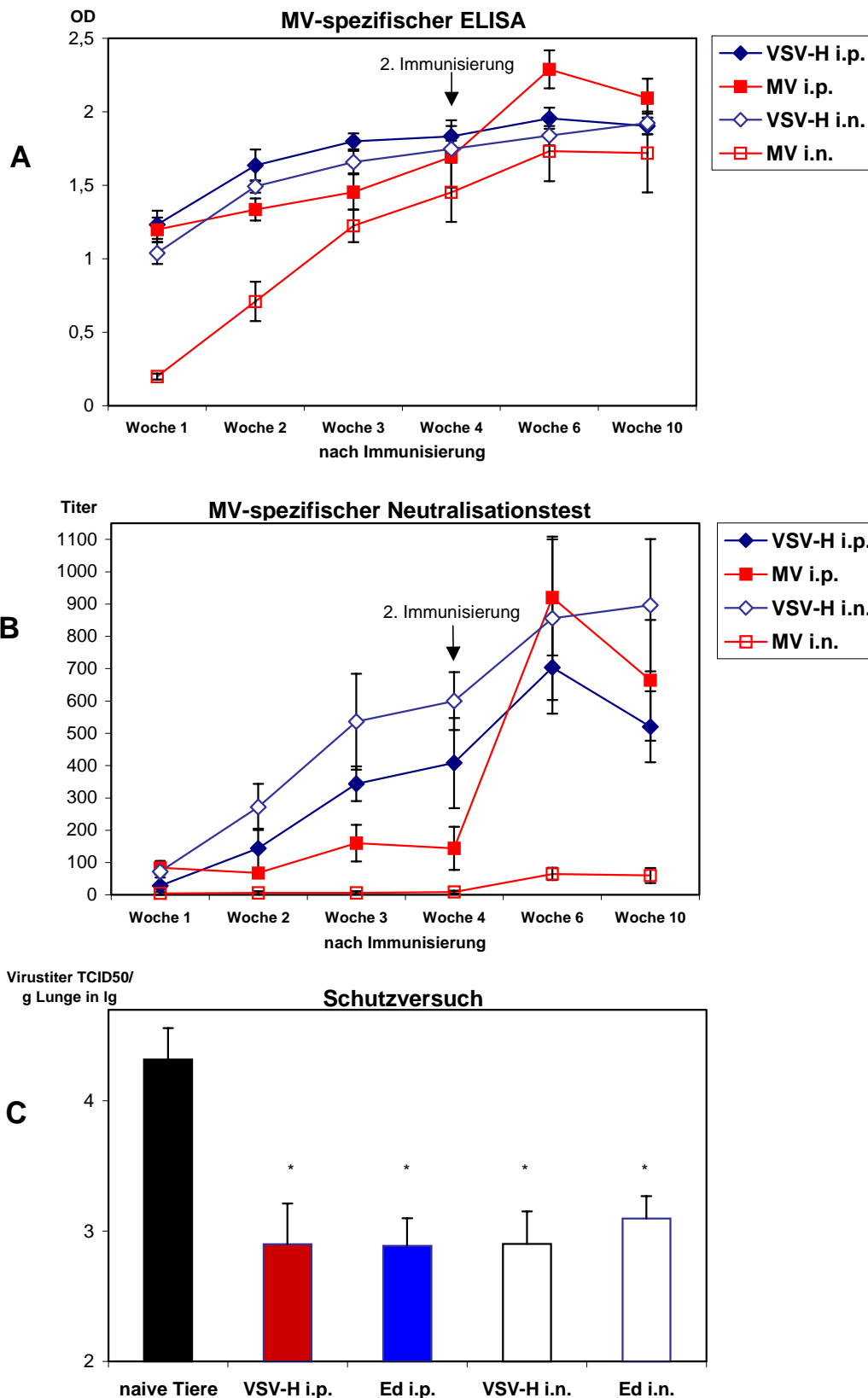


Abb. 11.: Baumwollratten wurden 2x im vierwöchigen Abstand mit 5×10^6 PBE VSV-H bzw. MV intraperitoneal bzw. intranasal immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut entnommen und der Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern bestimmt. 10 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert und 5 Tage später der Virustiter im Lungengewebe bestimmt. Mit *-gekennzeichnete Virustiter sind signifikant niedriger als Virustiter von naiven Tieren.

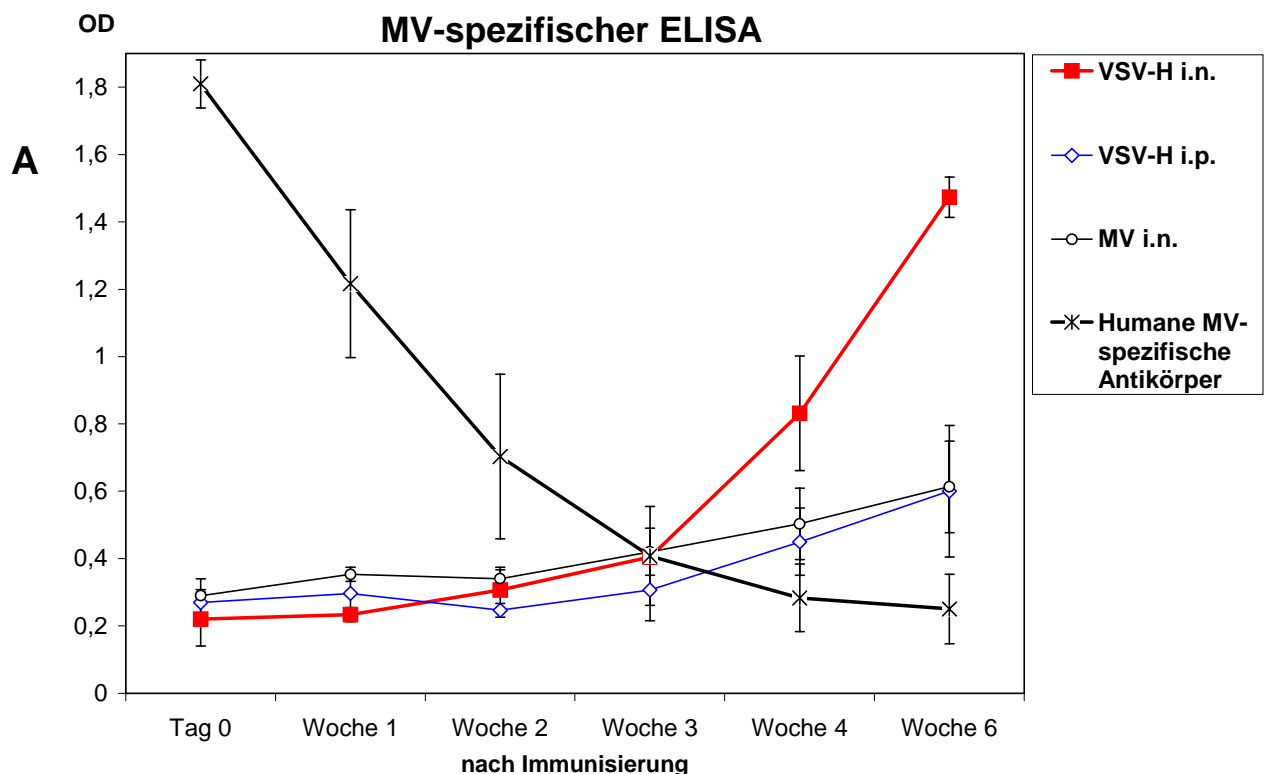
4.3.3. *In vitro* wird VSV-H durch MV-spezifische Antikörper nicht neutralisiert

Eine Immunisierung mit VSV-H induziert sehr schnell sehr hohe Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern. Eine sehr wichtige Frage ist, ob eine Immunisierung mit VSV-H durch maternale MV-spezifische Antikörper inhibiert wird oder ob eine Immunisierung mit VSV-H auch in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper zu einer Vakzine-induzierten Serokonversion und zu Schutz führt. Das MV-Hämagglutinin ist bei VSV-H zusätzlich in die Hüllmembran von VSV inkorporiert, besitzt aber keine Funktion bei der Virusreplikation oder Virusfreisetzung. Um zu überprüfen, ob MV-spezifische Antikörper VSV-H neutralisieren können, wurde das humane MV-spezifische Serum (NT = 320) und ein MV-spezifisches Hyperimmunserum aus der Baumwollratte (NT = 640) in einen VSV-H spezifischen Neutralisationstest *in vitro* untersucht. Beide Seren neutralisierten MV sehr effektiv, wohingegen VSV-H im Standardneutralisationstest nicht neutralisiert wurde. Lediglich im 10-fach sensitiveren Plaque-Reduktionsneutralisationstest konnte eine geringfügige Neutralisation von VSV-H durch das Humanserum bzw. durch das Baumwollratten-Hyperimmunserum festgestellt werden (PRNT = 40; bzw. 20). Ein Kontrollserum ohne MV-spezifische Antikörper führte nicht zu einer Plaque Reduktion. In dem Plaquereduktions-Neutralisationstest konnte gezeigt werden, daß die Bildung von VSV-H Plaques durch MV-spezifische Seren um etwa 12-24 Stunden verzögert wird im Vergleich zu Proben, die mit einem Kontrollserum ohne MV-spezifische Antikörper inkubiert wurden. Das bedeutet, daß MV-spezifische Antikörper VSV-H im Gegensatz zu MV nicht neutralisieren können. Lediglich die Replikationsgeschwindigkeit von VSV-H wird in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper etwas verringert.

4.3.4. VSV-H induziert MV-neutralisierende Antikörper in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper

In vitro entkommt VSV-H sehr effektiv der Neutralisation durch MV-spezifische Antikörper. Um zu untersuchen, ob VSV-H auch *in vivo* MV-spezifische Antikörper umgehen kann, wurden Baumwollratten intranasal bzw. intraperitoneal mit VSV-H bzw. als Kontrolle mit MV in Gegenwart von 16 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert (Abb. 12).

Am Tag der Immunisierung (Tag 0) konnte bei allen Tieren humane MV-spezifische und MV-neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. 6 Wochen nach Serumtransfer waren bei allen Gruppen keine humanen MV-spezifischen Antikörper mehr nachweisbar. Humane MV-neutralisierende Antikörper konnten nur in den ersten 2 Wochen im NT nachgewiesen werden (Abb. 12 A und B).



In Baumwollratten wurden MV-spezifische Antikörper nur nach intranasaler Immunisierung mit VSV-H induziert. Eine intraperitoneale Immunisierung mit VSV-H bzw. eine intranasale Immunisierung mit MV induzierte nur sehr niedrige Titer an Baumwollratten-MV-spezifischen Antikörpern, die aber nicht signifikant erhöht waren im Vergleich zu Titern von nicht immunisierten Tieren (Abb. 12 A).

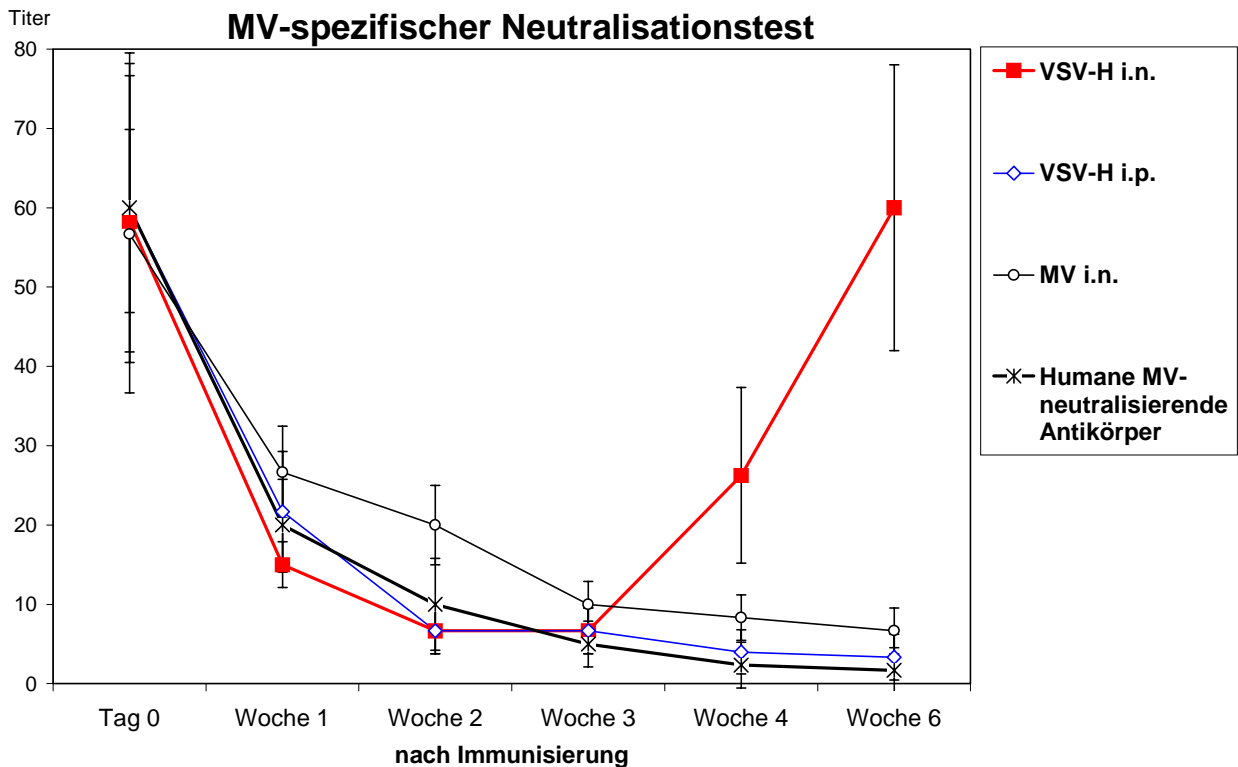


Abb. 12.: Baumwollratten wurden 1x intranasal bzw. intraperitoneal mit 5×10^7 PBE VSV-H bzw. intranasal mit 2×10^7 PBE MV in Gegenwart von 16 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert. Als Kontrolle wurde Baumwollratten 1ml Humanserum (16 IU) injiziert, diese aber nicht immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut entnommen und die Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern untersucht. 7 Wochen nach Immunisierung wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert und 5 Tage später der Virustiter in der Lunge bestimmt.

MV-neutralisierende Antikörper wurden ebenfalls nur nach intranasaler Immunisierung mit VSV-H in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper induziert (NT = 60). Eine intraperitoneale Immunisierung mit VSV-H und eine intranasale Immunisierung mit MV in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper induzierte keine MV-neutralisierenden Antikörper. Im Schutzversuch zeigte sich, daß nur eine intranasale Immunisierung mit VSV-H zu einer signifikanten Protektion führte (Virusreduktion um 1,3 logarithmische Stufen). Eine intraperitoneale Immunisierung mit VSV-H bzw. eine intranasale Immunisierung mit MV hingegen führte nicht zu einem signifikanten Schutz gegen eine respiratorische Infektion mit MV. Das bedeutet, daß VSV-H im Gegensatz zu MV in der Lage ist, bereits nach einer einmaligen intranasalen Immunisierung in Gegenwart MV-spezifischer „maternale“ Antikörper, MV-neutralisierende Antikörper und Protektion zu induzieren.

4.3.4.1. Der Immuisierungserfolg in Gegenwart maternaler Antikörper ist abhängig von der Immunisierungsdosis

Eine intranasale Immunisierung mit hohen Dosen (5×10^7 PBE) an VSV-H ist in der Lage, in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper Serokonversion und Schutz zu induzieren. Um zu überprüfen, ob niedrigere Immunisierungsdosen auch zur Vakzine-induzierten Serokonversion in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper führen, wurden Baumwollratten intranasal mit 5×10^5 , 5×10^6 , 2×10^7 und 5×10^7 PBE VSV-H in Gegenwart von 16 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert (Tab. 6). Bei Kontrolltieren, die mit VSV-WT immunisiert wurden, konnte keine MV-spezifische Immunantwort nachgewiesen werden. Baumwollratten, die mit VSV-H in Abwesenheit MV-spezifischer Antikörper immunisiert wurden, entwickelten hingegen eine sehr starke Immunantwort (Tab. 6 A). Bei Baumwollratten, die mit unterschiedlichen Immunisierungsdosen in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper immunisiert wurden, konnte mit Zunahme der Immunisierungsdosis auch ein Anstieg der Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen werden (Tab. 6 B). In diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß bereits eine einmalige Immunisierung mit 5×10^5 PBE VSV-H ausreicht, um in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper MV-neutralisierende Antikörper (NT = 17,5; OD = 1,1) zu induzieren. Der Grad der Vakzine-induzierten Serokonversion kann mit Zunahme der Immunisierungsdosis (5×10^7 PBE) deutlich erhöht werden (NT = 60; OD = 1,5).

	Humane MV-spezifische Antikörper	ELISA (OD ± SA)	Neutralisationstest (Titer ± SA)	Anzahl der Versuchstiere	
A	5x10 ⁷ PBE VSV-WT	---	0,3 ± 0,04	<10	3
	5x10 ⁷ PBE VSV-H	---	1,6 ± 0,1	320 ± 69	3
B	5x10 ⁵ PBE VSV-H	16 IU	1,1 ± 0,2	17,5 ± 3,5	2
	5x10 ⁶ PBE VSV-H	16 IU	1,2 ± 0,1	20 ± 0,0	2
	2x10 ⁷ PBE VSV-H	16 IU	1,3 ± 0,1	60 ± 16,3	4
	5x10 ⁷ PBE VSV-H	16 IU	1,5 ± 0,1	60 ± 20	4
C	2x10 ⁷ PBE VSV-H UV-inaktiviert	---	0,4 ± 0,02	<10	3
	2x10 ⁷ PBE VSV-H UV-inaktiviert	16 IU	0,4 ± 0,05	<10	3

Tab. 6.: A: Kontrolltiere wurden mit 5×10^7 PBE VSV-H bzw. VSV-WT_{rek} in Abwesenheit MV-spezifischer Antikörper immunisiert. B: Baumwollratten wurden intranasal mit den angegebenen Dosen an VSV-H in Gegenwart von 16 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert. C: Baumwollratten wurden intranasal mit 2×10^7 PBE UV-inaktiviertem VSV-H in An- bzw. Abwesenheit von 16 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert. 6 Wochen später wurde der Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern bestimmt.

4.3.4.2. Replikationsfähiges VSV-H ist essentiell, um eine MV-spezifische Immunantwort zu induzieren

Um zu überprüfen, ob eine VSV-H Replikation *in vivo* oder die alleinige Hämagglutininexpression mit Hilfe von VSV ausreichend ist, um maternale Antikörper zu umgehen, wurden Baumwollratten intranasal mit UV-inaktiviertem VSV-H in An- bzw. Abwesenheit von MV-spezifischen Antikörpern immunisiert (Tab. 6 C).

Nach intranasaler Immunisierung mit 2×10^7 PBE UV-inaktiviertem VSV-H wurden, unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit MV-spezifischer Antikörper, keine MV-neutralisierenden Antikörper ($NT < 10$) induziert. Es konnten nur sehr niedrige Titer an MV-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, die nicht signifikant unterschiedlich waren zu Titern von nicht immunisierten Tieren. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß replikationsfähiges VSV-H essentiell ist, um eine starke MV-spezifische Immunantwort zu induzieren und um in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper effektiv zu sein.

4.3.4.3. VSV-H ist auch in Gegenwart von natürlichen maternalen Antikörpern effektiv

VSV-H ist in der Lage, in Gegenwart humaner MV-spezifischer Antikörper eine erfolgreiche Immunisierung zu induzieren. Um zu überprüfen, ob VSV-H auch im Modellsystem für natürliche maternale Antikörper effektiv ist, wurden Nachkommen von MV-immunen Baumwollratten, die natürliche MV-spezifische maternale Antikörper zum Zeitpunkt der Immunisierung besaßen, mit VSV-H immunisiert (Abb. 13).

Hierzu wurden zwei Gruppen von Nachkommen MV-immuner Baumwollratten untersucht. Eine Gruppe wurde 5 Wochen nach der Geburt intranasal mit 5×10^6 PBE VSV-H immunisiert, während die 2. Gruppe (Kontrollgruppe) nicht immunisiert wurde. Zum Zeitpunkt der Immunisierung (Tag 0) besaßen alle Jungtiere protektive Titer ($NT > 36$; $OD > 0,93$) an maternalen MV-spezifischen Antikörpern. Bei den Kontrolltieren, die nicht immunisiert wurden, konnte ein zeitabhängiger Abbau der maternalen MV-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Nach 5 Wochen konnten keine neutralisierenden Antikörper und nur sehr niedrige Titer an MV-spezifischen Antikörpern detektiert werden.

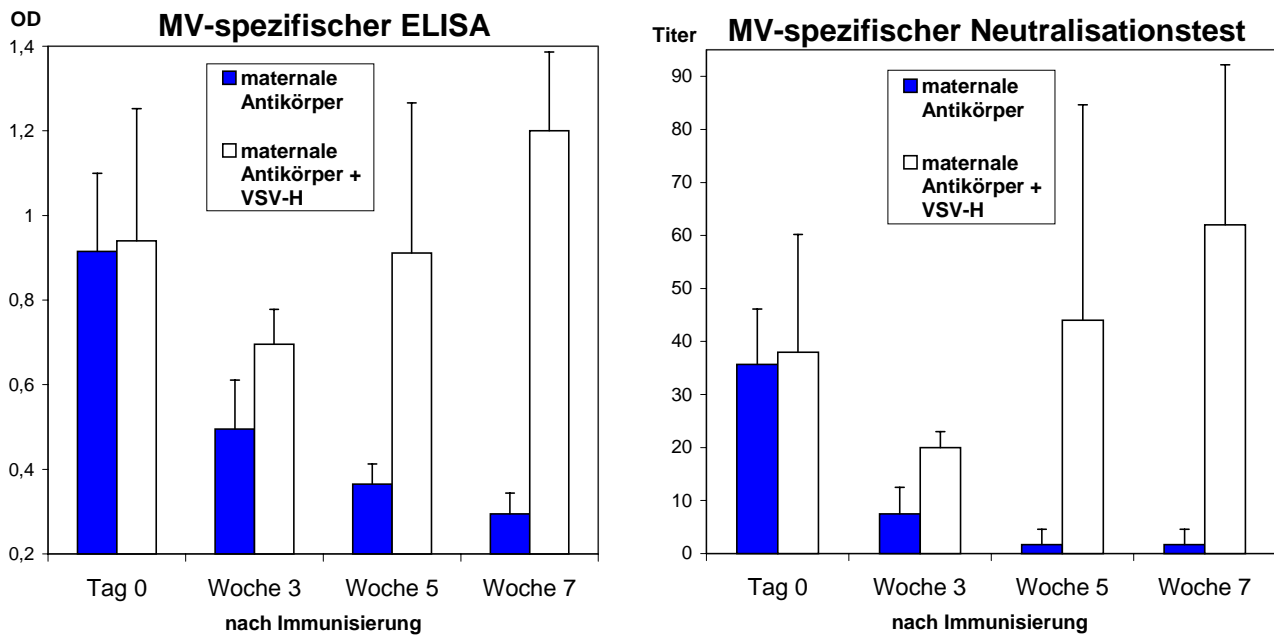


Abb. 13.: Nachkommen von MV-immunen Baumwollratten wurden intranasal mit 5×10^6 PBE VSV-H immunisiert. Als Kontrolle wurden Nachkommen von MV-immunen Baumwollratten untersucht, die nicht immunisiert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut entnommen und die Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern bestimmt.

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe wurde bei den immunisierten Jungtieren, auch in Gegenwart natürlicher maternaler MV-spezifischer Antikörper, eine MV-spezifische Immunantwort induziert. Bereits 3 Wochen nach Immunisierungsbeginn konnten bei den immunisierten Jungtieren schwach signifikant höhere Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern festgestellt werden als im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den immunisierten Jungtieren stiegen die Antikörpertiter kontinuierlich an und waren auf Woche 7 nach Immunisierung hoch signifikant erhöht als im Vergleich zur Kontrollgruppe. In diesem Versuch wurde bestätigt, daß VSV-H auch die Inhibition der Vakzine-induzierten Serokonversion durch natürliche maternale Antikörper umgehen kann.

4.3.5. Intratracheale Immunisierung mit VSV-H

VSV-H induziert nur nach intranasaler Immunisierung in Gegenwart maternalen Antikörper eine erfolgreiche MV-spezifische und protektive Immunantwort. Es wurde bereits gezeigt (Abb. 9), daß nur nach intranasaler Immunisierung eine *in vivo*-Replikation von VSV-H nachgewiesen werden konnte. Die VSV-H Replikation verteilte sich auf zwei Kompartimente. Zum einen war eine abortive Replikation in der Lunge in den ersten 5 Tagen nach Infektion nachweisbar, zum anderen replizierte VSV-H für acht Tage im Gehirn von immunisierten Baumwollratten. Hier stellte sich die Frage, inwieweit die Replikation von VSV-H in der Lunge, im Gehirn oder in beiden Kompartimenten ausschlaggebend ist, um maternale Antikörper zu umgehen.

Mit Hilfe der intratrachealen Immunisierungsrouten ist es möglich, gezielt eine Immunisierung der Lunge zu induzieren. Um auszuschließen, daß VSV-H nach intratrachealer Immunisierung im Gehirn repliziert, wurden Baumwollratten intratracheal mit 2×10^7 PBE VSV-H immunisiert und der Virustiter im Gehirn bestimmt. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß nach intratrachealer Immunisierung keine VSV-H Replikation im Gehirn stattfindet. Nach intratrachealer Immunisierung mit 2×10^7 PBE VSV-H wurde eine starke MV-spezifische Immunantwort induziert (NT = 328). Um zu untersuchen, ob eine alleinige Replikation von VSV-H im unteren Respirationstrakt ausreicht, in Gegenwart maternalen Antikörper Serokonversion und Schutz zu induzieren, wurden Baumwollratten intratracheal mit 2×10^7 PBE VSV-H in Gegenwart von 16 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert. Zum Vergleich wurden Baumwollratten mit derselben Immunisierungsdosis an VSV-H intranasal in Gegenwart von 16 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert (Abb.14).

Sowohl eine intranasale als auch eine intratracheale Immunisierung mit VSV-H, in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper, führte zur Induktion von MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern. Die Kinetik der Antikörperinduktion war in beiden Gruppen vergleichbar. Die Endtiter an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern waren nach intratrachealer Immunisierung geringfügig niedriger als nach intranasaler Immunisierung. Der Unterschied war aber nicht statistisch signifikant. Im Schutzversuch konnte bestätigt werden, daß beide Gruppen hoch signifikant vor einer respiratorischen Infektion mit MV geschützt waren (Virusreduktion um mehr als 2 logarithmische Stufen). Das bedeutet, daß auch eine intratracheale Immunisierung mit VSV-H in der Lage ist, die Inhibition der Vakzine-induzierten Serokonversion durch maternale Antikörper zu überwinden.

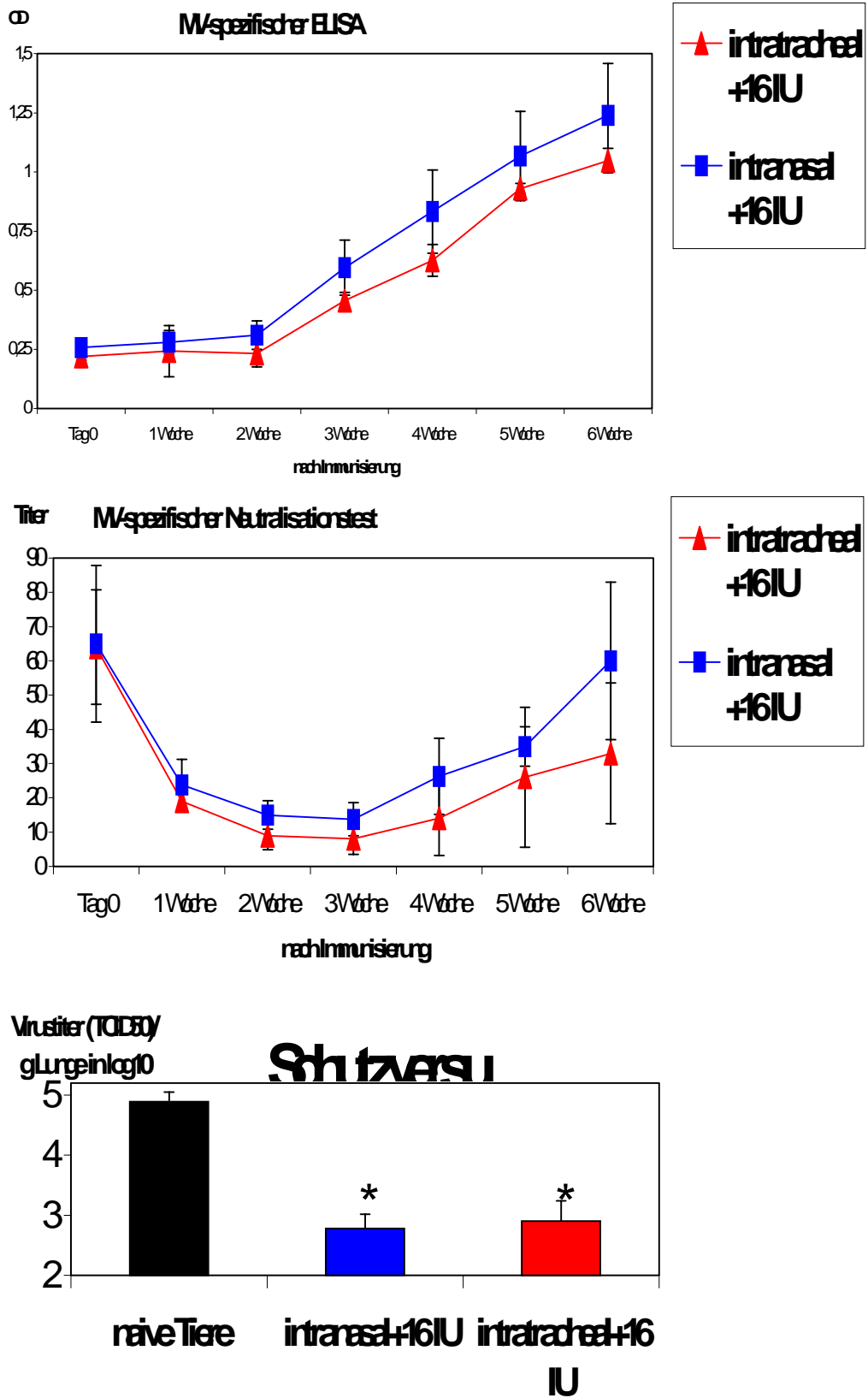


Abb. 14.: Baumwollratten wurden intratracheal bzw. intranasal mit 2×10^7 PBE VSV-H in Gegenwart von 16 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut entnommen und die Titer an MV-spezifischen Antikörpern im ELISA bzw. NT überprüft. 7 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert und 5 Tage später der Virustiter in der Lunge bestimmt.

4.3.6. Intrazerebrale Immunisierung mit VSV-H

Um zu überprüfen, ob eine intrazerebrale Replikation von VSV-H im Verlauf einer Immunisierung in Gegenwart maternaler Antikörper Einfluß nimmt auf die Vakzine-induzierte Serokonversion, wurden Baumwollratten intrazerebral mit VSV-H immunisiert. Hierbei zeigte sich, daß Baumwollratten äußerst suszeptibel sind für eine intrazerebrale Infektion mit VSV-H. Bereits eine Infektion mit 10 PBE VSV-H war ausreichend, daß die Tiere innerhalb von 3-4 Tagen moribund wurden und getötet werden mußten. Um die intrazerebrale Immunisierungsrouten näher charakterisieren zu können, wurden die VSV-H Deletionsmutanten CT 9-H und CT 1-H verwendet.

4.3.6.1. VSV-H Deletionsmutanten CT 9-H und CT 1-H

Die VSV-H Deletionsmutanten CT 9-H und CT 1-H wurden im Labor von John K. Rose hergestellt. Die VSV Deletionsmutanten CT 9 und CT 1 sind im Vergleich zu VSV *in vitro* und *in vivo* attenuiert. Um zu überprüfen, inwieweit die VSV-H Deletionsmutanten CT 9-H und CT 1-H attenuiert sind, wurden diese Stämme zunächst in der Zellkultur charakterisiert (Tab. 8).

Charakteristika	VSV-H	CT 9	CT 1
zytoplasmatischer Anteil des VSV-G Proteins	29 AS	9 AS	1 AS
Maximaltiter	$5-7 \times 10^8$ /ml	$1-2 \times 10^8$ /ml	5×10^6 /ml
Wachstum	sehr schnell, Maximaltiter nach 16-24h	schnell, Maximaltiter nach 20-24h	langsam, Maximaltiter nach 48-60h
Plauegröße	normale Größe	geringfügig kleiner	deutlich kleiner
Attenuierung	stark attenuiert	noch stärker attenuiert	am stärksten attenuiert

Tab. 8.: Charakterisierung der VSV-H Deletionsmutanten CT 9-H und CT 1-H. Die VSV-H Deletionsmutanten CT 9-H und CT 1-H wurden in der Zellkultur hinsichtlich ihrer Maximaltiter, Replikationsgeschwindigkeit und Plauegröße mit VSV-H verglichen.

In der Zellkultur wuchsen diese Mutanten zu niedrigeren Virustitern als VSV-H. Der maximale Virustiter, der nach Infektion von BHK 21 Zellen erreicht wurde, reduzierte sich im Vergleich zu VSV-H bei CT 9 um den Faktor 2-4 und bei CT 1 um den Faktor 100. Auch die Wachstumskinetik von VSV-H, CT 9 und CT 1 war unterschiedlich. Während CT 9 nur etwas langsamer wuchs als VSV-H, benötigte CT 1 deutlich länger, um maximale Titer zu erreichen. Makroskopisch wurden nach Infektion mit CT 9 geringfügig kleinere und nach Infektion mit CT 1 deutlich kleinere Plaques sichtbar als nach Infektion mit VSV-H. Diese Ergebnisse bestätigten, daß CT 9-H und CT 1-H noch stärker attenuiert sind als VSV-H.

In vivo konnte gezeigt werden, daß diese Mutanten eine verminderte Neurovirulenz aufweisen. Nach intranasaler Infektion mit 5×10^5 PBE CT 1-H (höchstmögliche Infektionsdosis, aufgrund des niedrigen Virusstocks) konnte kein Virus aus dem Gehirn infizierter Baumwollratten nachgewiesen werden. Während nach intranasaler Infektion mit 5×10^5 PBE CT 9-H nur bei einzelnen Tieren Virus im Gehirn gefunden wurde (TCID₅₀ = $1,9 \pm 1,8$), konnte nach Infektion mit 5×10^5 PBE VSV-H bei allen Tieren Virus nachgewiesen werden (TCID₅₀ = $2,9 \pm 1,6$). Hiermit wurde bestätigt, daß die VSV-H Deletionsmutante CT 1-H, zumindest nach Infektion mit niedrigen Infektionsdosen (5×10^5 PBE), nicht mehr neurovirulent ist. Nach intranasaler Infektion mit hohen Dosen (2×10^7 PBE) VSV-H bzw. CT 9-H konnte nachgewiesen werden, daß die Neurovirulenz von CT 9-H im Vergleich zu VSV-H ebenfalls vermindert ist (Abb. 15). Die intrazerebrale Replikation von CT 9-H ist zeitlich verzögert und die Virustiter sind um mehr als 1,5 logarithmische Stufen niedriger als nach Infektion mit VSV-H.

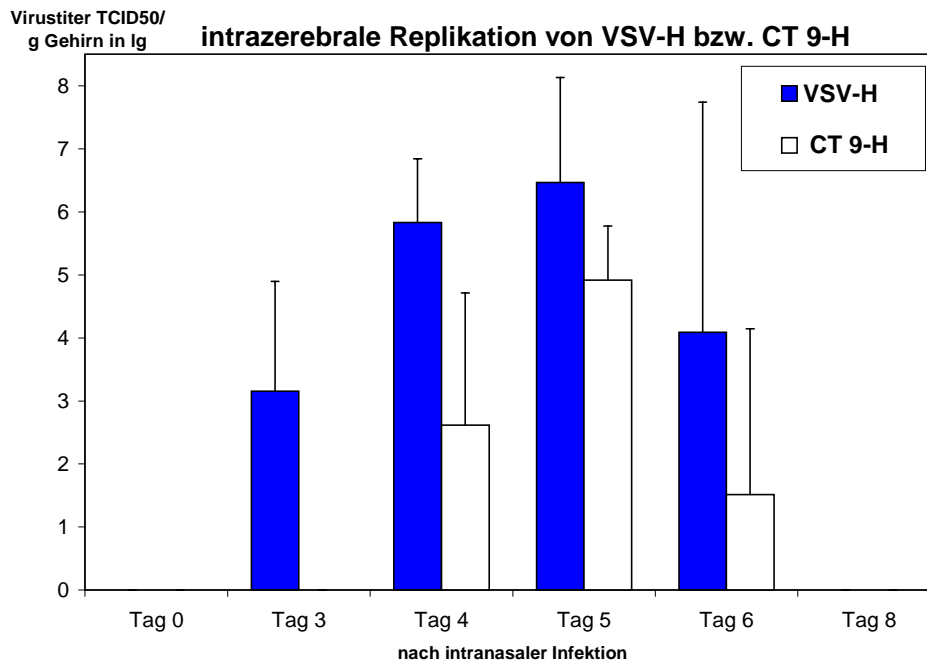


Abb. 15.: Baumwollratten wurden intranasal mit 2×10^7 PBE VSV-H bzw. CT 9-H infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten der Virustiter im Gehirn bestimmt.

4.3.6.2. Intrazerebrale Immunisierung mit CT 9-H

Im Gegensatz zu VSV-H verlief eine intrazerebraler Infektion mit einer Infektionsdosis von bis zu 1×10^3 PBE CT 9-H bei Baumwollratten klinisch unauffällig. Um zu überprüfen, ob eine intrazerebrale Replikation im Verlauf einer Immunisierung in Gegenwart maternaler Antikörper Einfluß nimmt auf die Vakzine-induzierte Serokonversion, wurden Baumwollratten intrazerebral in An- bzw. Abwesenheit MV-spezifischer Antikörper mit CT 9-H immunisiert (Tab. 9).

6 Wochen nach Immunisierung	Immunisierungsdosis				naive Tiere + 0 IU
	1×10^2 CT 9-H + 0 IU	2×10^2 CT 9-H + 0 IU	5×10^2 CT 9-H + 0 IU	1×10^3 CT 9-H + 16 IU	
ELISA (OD)	0,21 ± 0,04	0,24 ± 0,11	0,20 ± 0,04	0,29 ± 0,11	0,23 ± 0,08
MV-NT (Titer)	<10	<10	<10	<10	<10
VSV-NT (Titer)	<10	<10	<10	<10	<10

Tab.9.: Baumwollratten wurden intrazerebral mit den angegebenen Dosen an CT 9-H in Abwesenheit (+ 0 IU) oder Anwesenheit (+ 16 IU) MV-spezifischer Antikörper immunisiert. Als Kontrolle wurden naive Tiere untersucht. 6 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurde den Tieren Blut entnommen und der Titer an MV-spezifischen und VSV-spezifischen Antikörpern bestimmt.

Die intrazerebrale Immunisierung verlief bei allen Tieren klinisch unauffällig. 6 Wochen nach Immunisierungsbeginn konnten weder MV- noch VSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Eine intrazerebrale Immunisierung mit CT 9-H führte nicht zur Induktion einer MV-spezifischen bzw. einer VSV-spezifischen Immunantwort, unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit maternaler Antikörper. In diesem Versuch wurde bestätigt, daß die intratracheale Replikation von VSV-H, nicht die intrazerebrale Replikation essentiell ist, um in Gegenwart maternaler Antikörper eine MV-spezifische Immunantwort zu induzieren.

4.3.7. Immunogenität der Deletionsmutanten CT 9-H und CT 1-H

Die Deletionsmutanten CT 9-H und CT 1-H sind im Vergleich zu VSV-H *in vitro* und *in vivo* attenuiert. Um die Immunogenität der Deletionsmutanten CT 9-H und CT 1-H mit VSV-H zu vergleichen, wurden Baumwollratten intranasal mit CT 1-H, CT 9-H und VSV-H immunisiert. Da die maximale Immunisierungsdosis für CT 1-H bei 5×10^5 PBE liegt, wurde eine Gruppe von Baumwollratten mit niedrigen Dosen (5×10^5 PBE) CT 1-H bzw. CT 9-H und eine andere Gruppe mit hohen Dosen (2×10^7 PBE) CT 9-H bzw. VSV-H immunisiert (Abb. 16.).

Eine Immunisierung mit CT 1-H induzierte signifikant niedrigere Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern als eine Immunisierung mit CT 9-H bzw. VSV-H (Abb. 16 A und B). Im Gegensatz dazu induzierte eine Immunisierung mit CT 9-H sehr hohe Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern, die nicht signifikant niedriger waren, als nach Immunisierung mit VSV-H. Im Schutzversuch konnte gezeigt werden, daß sowohl eine Immunisierung mit CT 1-H, CT 9-H und mit VSV-H einen hoch signifikanten Schutz (Virusreduktion um mehr als 1,5 logarithmische Stufen) induzierte (Abb. 16 C). Die Protektion war nach Immunisierung mit hohen Dosen an VSV-H bzw. CT 9-H am ausgeprägtesten (Virusreduktion um mehr als 2,5 logarithmische Stufen). Im Gegensatz dazu fiel der Schutz nach Immunisierung mit CT 1-H deutlich niedriger aus (Virusreduktion um 1,5 logarithmische Stufen).

In diesem Versuch konnte bestätigt werden, daß die Deletionsmutanten CT 9-H und CT 1-H ebenfalls in der Lage sind eine MV-spezifische und protektive Immunantwort zu induzieren. CT 1-H induzierte aber signifikant niedrigere Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern und einen niedrigeren Schutz als eine Immunisierung mit CT 9-H bzw. VSV-H. Im Gegensatz dazu induziert CT 9-H ähnliche Titer an MV-spezifischen/neutralisierenden Antikörpern und eine vergleichbare Protektion als VSV-H.

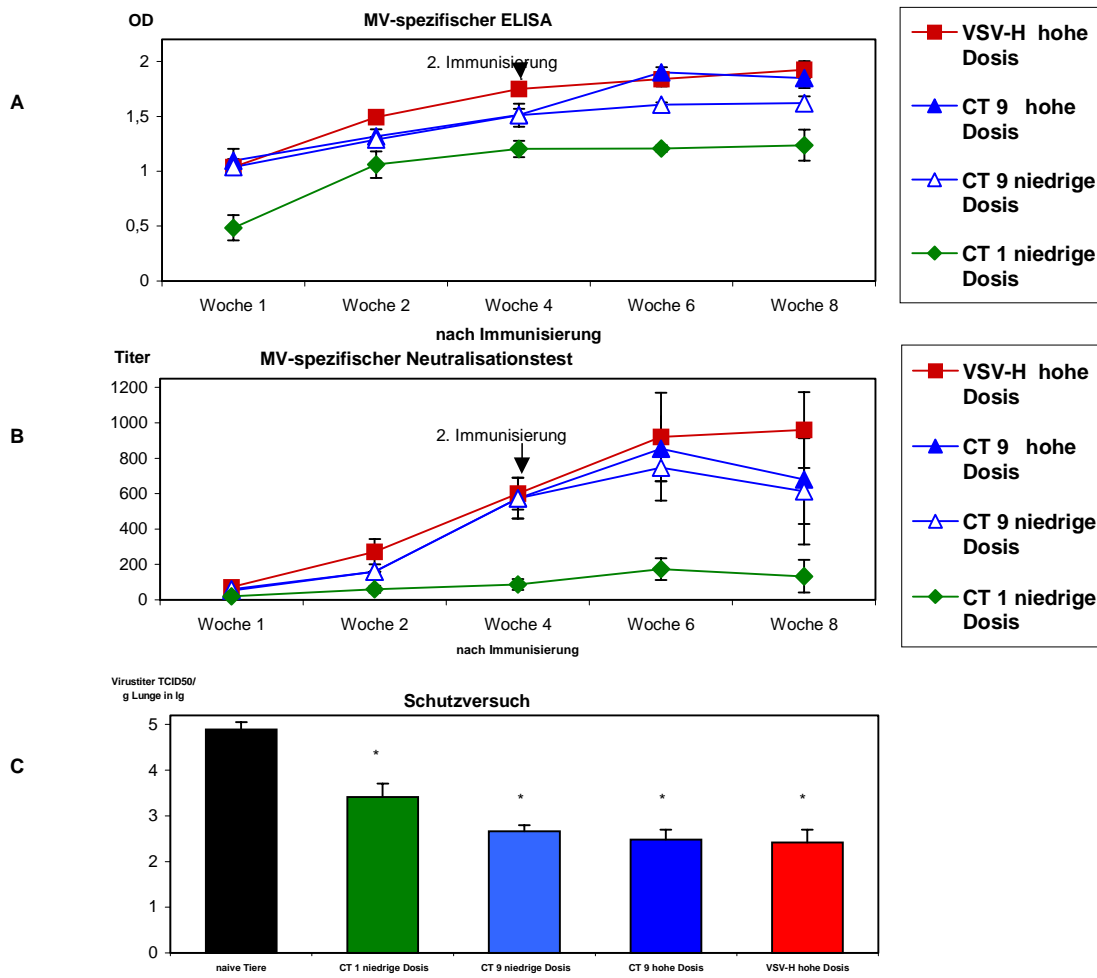


Abb. 16.: Baumwollratten wurden intranasal mit niedrigen Dosen (5×10^5 PBE) CT 9-H bzw. CT 1-H oder mit hohen Dosen (2×10^7 PBE) CT 9-H bzw. VSV-H 2x im vierwöchigen Abstand immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut entnommen und der Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern bestimmt (A und B). 7 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert und 5 Tage später der Virustiter in der Lunge (C) bestimmt. Mit *-gekennzeichnete Virustiter sind hoch signifikant ($p < 0,006$) niedriger als im Vergleich zu Titern von naiven Tieren.

4.3.8. Immunogenität von CT 9-H und CT 1-H in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper

VSV-H induziert nach intranasaler Immunisierung in Gegenwart maternaler Antikörper eine MV-spezifische und protektive Immunantwort. Um zu klären, ob die Deletionsmutanten CT 9-H bzw. CT 1-H auch in Gegenwart von MV-spezifischen Antikörpern effektiv sind, wurden Baumwollratten intranasal mit 5×10^5 PBE (höchstmögliche Immunisierungsdosis für CT 1) CT 1-H und CT 9-H bzw. mit 2×10^7 PBE CT 9-H und VSV-H in Gegenwart von 16 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert (Abb. 17).

Bei Baumwollratten, die mit 5×10^5 PBE CT 1 in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper immunisiert wurden, konnten nur sehr niedrige Titer an MV-spezifischen Antikörpern

nachgewiesen werden, die nicht signifikant erhöht waren im Vergleich zu Kontrolltieren, die mit VSV-WT_{rek} immunisiert wurden (Abb. 17 A). MV-neutralisierende Antikörper wurden nicht induziert nach Immunisierung mit CT 1-H und diese Tiere waren auch nicht gegen eine respiratorische Infektion mit MV geschützt (Abb. 17 B, C). Im Gegensatz dazu war bereits eine einmalige Immunisierung mit 5×10^5 PBE (niedrige Dosis) CT 9 in Gegenwart humaner Antikörper ausreichend, um signifikant erhöhte Titer an MV-spezifischen (OD = 1,18) und MV-neutralisierenden Antikörpern (NT = 33) zu induzieren. Diese Tiere waren hoch signifikant gegen eine intranasale Infektion (Virusreduktion = 1,65 logarithmische Stufen) mit MV geschützt. Eine Immunisierung mit hohen Dosen an CT 9-H (2×10^7 PBE) in Gegenwart MV-spezifischer Antikörper induzierte identische Titer an MV-spezifischen (OD = 1,3) und MV-neutralisierenden Antikörpern (NT = 60), sowie eine vergleichbare Protektion (Virusreduktion um mehr als 1,9 logarithmische Stufen) als eine Immunisierung mit 2×10^7 PBE VSV-H. Dieser Versuch zeigte, daß die im Vergleich zu VSV-H schwach attenuierte Mutante CT 9-H, in ähnlicher Weise wie VSV-H eine MV-spezifische und protektive Immunantwort in Gegenwart maternaler Antikörper induziert. Die im Vergleich zu VSV-H stark attenuierte Mutante CT 1-H führte nicht zu einer Vakzine-induzierten Serokonversion und zu Protektion in Anwesenheit maternaler Antikörper.

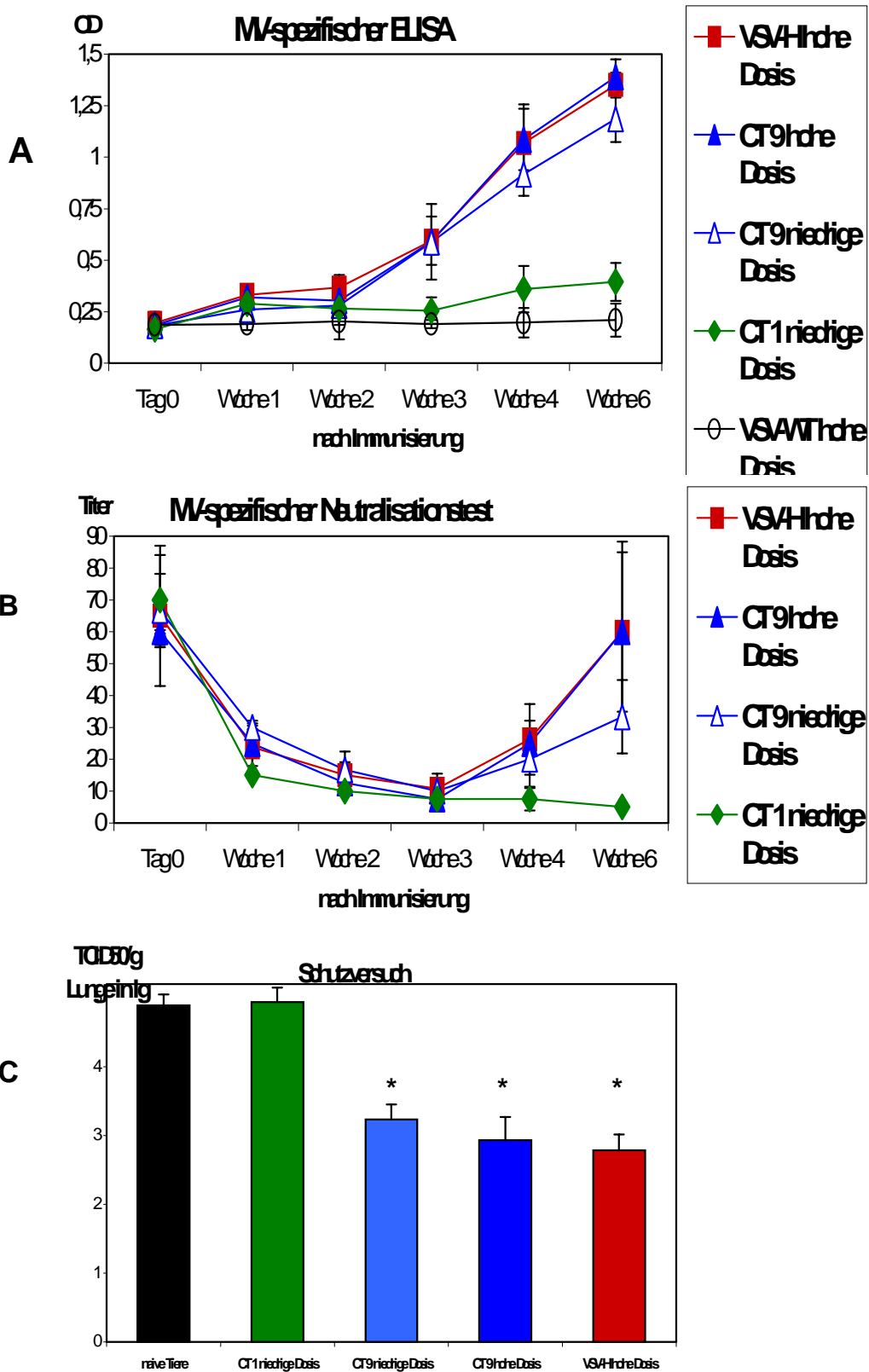


Abb. 17.: Baumwollratten wurden intranasal mit niedrigen Dosen (5×10^5 PBE) CT 9-H bzw. CT 1-H oder mit hohen Dosen (2×10^7 PBE) CT 9-H bzw. VSV-H in Gegenwart 16 IU MV-spezifischer Antikörper immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut entnommen und der Titer an MV-spezifischen und MV-neutralisierenden Antikörpern bestimmt (A und B). 7 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurden die Tiere intranasal mit MV infiziert und 5 Tage später der Virustiter in der Lunge (C) bestimmt. Mit *-gekennzeichnete Virustiter sind hoch signifikant ($p < 0,006$) niedriger als Titer von naiven Tieren

5. Diskussion

Bereits innerhalb des ersten Lebensjahres erkranken viele Kleinkinder an Masern und der Anteil an schweren Krankheitsverläufen mit letalem Ausgang ist in dieser Altersgruppe besonders hoch. Aus diesem Grund wäre es sehr wichtig, wenn man Säuglinge bereits in den ersten Lebensmonaten erfolgreich gegen Masern immunisieren könnte. Da eine Immunisierung mit dem derzeitigen MV-Impfstoff in den ersten Lebensmonaten durch maternale MV-spezifische Antikörper inhibiert wird, ist es notwendig neuartige Impfstoffe zu entwickeln, die in Gegenwart maternalen Antikörper effektiv sind. Für die Entwicklung und Erprobung neuartiger MV-Impfstoffe stand lange Zeit das Affenmodell als einziges Tiermodell zur Verfügung. Obwohl Affen eine dem Menschen sehr ähnliche Erkrankung entwickeln, ist ihr Einsatz für die Masernvirusforschung durch die hohen Kosten, das Fehlen von Inzuchtieren und vor allem durch das geringe Angebot an Tieren beschränkt. Kürzlich wurde berichtet, daß der hohe Bedarf an Affen (hauptsächlich in der HIV-Forschung) nicht mehr gedeckt werden kann. Versuchstiere können erst nach einer Wartezeit von mehreren Monaten bis zu einem Jahr geliefert werden, was zu einer deutlichen Einschränkung des Tiermodells führt (John Cohen, 2000). Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, eine kostengünstige Alternative zum Affenmodell zu entwickeln, bei der die Verfügbarkeit von Versuchstieren keinen limitierenden Faktor darstellt.

In Nagetiermodellen, wie der Maus (Griffin, et al., 1974) oder der Ratte (Liebert und ter Meulen, 1987) kann nur nach intrazerebraler Inokulation mit einem neurotrophen, an Nagetiere adaptierten Masernvirus eine Enzephalitis induziert werden. Alle anderen Applikationsarten führen nicht zu einer MV-Replikation. Bei Protektionsversuchen im Enzephalitismodell ist es aber fraglich, ob eine Immunreaktion, die gegen eine Enzephalitis schützt, auch protektiv gegen akute Masern ist. Da in diesen Nagetiermodellen eine intranasale Infektion nicht zur Virusreplikation in der Lunge führt, sind sie kein geeignetes Tiermodell für die Entwicklung alternativer MV-Impfstoffe.

Im Gegensatz dazu konnte in der hier vorgestellten Arbeit gezeigt werden, daß Baumwollratten alternativ zum Affen ein hervorragendes Tiermodell sind, um die Immunogenität potentieller Impfvektoren und ihre Effektivität in der Gegenwart maternalen Antikörper zu testen. Obwohl die Baumwollratte im Gegensatz zum Rhesusaffen klinisch keine Masern entwickelt, entsteht nach MV-Infektion eine dem Menschen in vielerlei Punkten ähnliche Immunantwort. Baumwollratten sind das einzige Nagetiermodell, in dem nach respiratorischer Infektion eine Masernvirus-Replikation (mit

Impfstämmen und mit Wildtypviren) in der Lunge nachgewiesen werden kann. Nach Immunisierung mit einem MV-Impfstamm sind Baumwollratten wie der Mensch gegen eine Infektion mit MV-Wildtypviren geschützt (Wyde, et al., 1999) und wie bei Säuglingen wird eine Immunisierung mit MV in Gegenwart maternaler Antikörper inhibiert. Somit sind Baumwollratten sehr gut geeignet, um die Effektivität neuartiger MV-Impfstoffe in Gegenwart maternaler Antikörper zu untersuchen. Im Vergleich zum Affen (Kalter, et al., 1997) hat die Baumwollratte den Vorteil, daß sie ein kostengünstiges Inzuchttier mit einem definierten Hygienestatus ist (Faith, et al., 1997), (Prince, et al., 1994), (Niewiesk, et al., 1997) und in ausreichender Menge zur Verfügung steht.

Die Bekämpfung von Infektionskrankheiten mit hohem Infektionsdruck im Säuglingsalter macht es notwendig, Impfstoffe zu entwickeln, die bereits in den ersten Lebensmonaten anwendbar sind. Ein weit verbreitetes Problem, das nicht auf Masern beschränkt ist, ist die Inhibition der Immunisierung durch maternale Antikörper. Maternale Antikörper beeinträchtigen auch die Impfstoffentwicklung gegen Infektionen mit dem Respiratorischen Synzytial Virus (RSV) und gegen Infektionen mit dem humanen Parainfluenza Virus Typ 3 (PIV3) (Zur Übersicht (Crowe, et al., 1997)). Bei Tetanus bzw. Diphtherie-Immunisierungen in den ersten Lebensmonaten in Gegenwart maternaler Antikörper wird die Vakzine-induzierte Serokonversion ebenfalls inhibiert (Björkholm, et al., 1995), (Englund, et al., 1995). Hier kann die Inhibition durch maternale Antikörper durch wiederholte Immunisierungen wieder aufgehoben werden. Zur globalen Bekämpfung der Masern sind Mehrfach-Immunisierungen im ersten Lebensjahr aus praktischen Gründen nicht möglich. Vordringlich in Entwicklungsländern müssen auch migrierende Populationen sicher mit einer einmaligen Immunisierung geschützt werden. Obwohl die Problematik der Immunisierung in Gegenwart maternaler Antikörper seit langem bekannt ist, ist der Inhibitionsmechanismus durch maternale Antikörper nur unvollständig analysiert. In der Zellkultur konnte gezeigt werden, daß passiv transferierte Antikörper (maternale Antikörper oder injizierte Immunglobuline), die ihr spezifisches Antigen gebunden haben, über ihren freien Fc-Teil an den Fc-Rezeptor auf B-Zellen binden. Wird das spezifische Antigen zusätzlich über den membranständigen B-Zellrezeptor gebunden, dann kommt es zu einer Interaktion zwischen dem membranständigen B-Zellrezeptor und dem Fc-Rezeptor. Diese Interaktion führt bei diesen B-Zellen zu einem negativen Signal und induziert Toleranz (D'Ambrosio, et al., 1995). Im

Gegensatz dazu binden Antigen-spezifische B-Zellen in Abwesenheit passiv transferierter Antikörper das Antigen nur über ihren Membran-ständigen B-Zellrezeptor und werden zu einer Immunantwort aktiviert. Aus dieser Beobachtung wurde geschlossen, daß dies der Mechanismus ist, durch den maternale Antikörper eine Immunisierung inhibieren. Mit diesem Mechanismus kann aber nicht erklärt werden, warum *in vivo* eine Immunisierung nur nach passivem Transfer von Antikörpern inhibiert wird, während in immunen Individuen eine Immunisierung in Gegenwart von Antigen-spezifischen Antikörpern zu einer verstärkten Antikörperproduktion (Booster-Effekt) führt.

In der vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, daß der inhibitorische Effekt von passiv transferierten MV-spezifischen Antikörpern auf eine Immunisierung mit MV und mit alternativen Impfstoffen sehr gut im Baumwollrattenmodell untersucht werden kann. Zu diesem Zweck wurden zwei Modellsysteme für maternale Antikörper getestet. Um ein Modell für natürliche maternale Antikörper zu entwickeln, wurden Weibchen mit MV immunisiert und deren Nachkommen (mit maternalen Antikörpern) für Immunisierungsversuche verwendet. Als 2. Modell für maternale Antikörper wurde ein hochtitriges MV-spezifisches Humanserum verwendet, um maternale Antikörper zu simulieren. Im Vergleich zu natürlichen maternalen Antikörpern besitzt das heterologe Modellsystem für maternale Antikörper drei Vorteile: Die humanen MV-spezifischen Antikörper werden schneller abgebaut als natürliche maternale Antikörper, was zu einem zügigeren Versuchsablauf führt. Nach Injektion einer definierten Antikörpermenge variieren die Titer an MV-spezifischen Antikörpern weniger stark zwischen den Versuchstieren als bei Nachkommen von MV-immunen Weibchen und damit erhöht sich die Versuchsaussagekraft. Im ELISA kann zwischen passiv transferierten humanen Antikörpern ("maternale Antikörper") und aktiv induzierten Baumwollrattenantikörpern (Immunisierungs-induzierte Antikörper) eindeutig unterschieden werden. Somit kann zu jedem Zeitpunkt nach Immunisierung die Induktion von MV-spezifischen Antikörpern in Gegenwart maternaler Antikörper im ELISA nachgewiesen werden. Im Affenmodell (van Binnendijk, et al., 1995) und im Mausmodell für maternale Antikörper (Siegrist, et al., 1998) werden durch Injektion eines homologen MV-spezifischen Serums maternale Antikörper simuliert. Da die injizierten Antikörper von der gleichen Tierspezies stammen, ist es in diesen Tiermodellen nicht möglich zwischen passiv transferierten maternalen Antikörpern und aktiv generierten Antikörpern zu unterscheiden. In diesen Tiermodellen

kann erst nach Monaten (nach völligem Abbau der passiv transferierten MV-spezifischen Antikörper) der Grad der Vakzine-induzierten Serokonversion bestimmt werden.

Im Baumwollrattenmodell inhibieren humane MV-spezifische Antikörper ebenso wie natürliche maternale Antikörper wie beim Menschen die Vakzine-induzierte Serokonversion. Der Grad der Inhibition ist abhängig vom Titer an maternalen Antikörpern. Hier konnte gezeigt werden, daß auch niedrige Titer an maternalen Antikörpern die Induktion von MV-neutralisierenden Antikörpern stark inhibieren, während die Induktion einer MV-spezifischen T-Zellantwort nur durch sehr hohe Titer an MV-spezifischen Antikörpern inhibiert werden konnte. Im Mausmodell für maternale Antikörper wurde festgestellt, daß die MV-spezifische T-Zellantwort im Gegensatz zur B-Zellantwort durch maternale Antikörper nicht inhibiert wird (Siegrist, et al., 1998). In anderen experimentellen Systemen wurde wiederum berichtet, daß die T-Zellantwort durch maternale Antikörper inhibiert wird (Harte, et al., 1983), (Xiang, et al., 1992). Der Unterschied zwischen dem Mausmodell und Baumwollrattenmodell für maternale Antikörper bezüglich der Induktion einer T-Zellantwort in Gegenwart maternalen Antikörper könnte damit erklärt werden, daß im Mausmodell die Titer an MV-spezifischen Antikörpern gerade ausreichend waren, um die Vakzine-induzierte Serokonversion effektiv zu inhibieren, während diese Titer nicht hoch genug waren, um die T-Zellantwort zu inhibieren.

Die sogenannte genetische oder Plasmidimmunisierung ist eine für die Impfstoffentwicklung häufig eingesetzte Immunisierungsform, weil das gewünschte Protein in der eukaryonten Form (z. B. mit Glykosilierung) exprimiert wird und der Impfstoff nicht virulent ist (Koprowski, et al., 1998). Die Möglichkeit der DNS-Vakzinierung wurde für die Masernvirusimpfung bisher nur in Mäusen und Kaninchen getestet (Cardoso, et al., 1998), (Fooks, et al., 1996), (Yang, et al., 1997). Dabei wurde festgestellt, daß die MV-Hauptantigene (Hämagglutinin, Fusionsprotein und Nukleokapsidprotein) über Plasmide *in vivo* exprimiert werden und immunogen sind. Die Protektion gegen eine respiratorische Infektion mit MV konnte in diesen Tiermodellen nicht untersucht werden. In Baumwollratten induzierten Plasmide, welche das Nukleokapsid-, das Fusions- und das Hämagglutininprotein exprimieren, ebenfalls eine MV-spezifische T-Zell- und B-Zellantwort. Aber nur die Induktion von MV-neutralisierenden Antikörpern, zusätzlich zu einer MV-spezifischen T-Zellantwort führte

zu Schutz vor respiratorischer Infektion mit MV. Baumwollratten, die mit N-exprimierenden Plasmiden immunisiert wurden, zeigten eine starke N-spezifische T-Zellantwort und hohe Titer an N-spezifischen Antikörpern. Nukleokapsid-spezifische Antikörper konnten das MV *in vitro* nicht neutralisieren und die N-spezifische T- und B-Zellantwort führte *in vivo* nicht zu Schutz gegen eine respiratorische Infektion mit MV. Im Gegensatz dazu konnten virale und bakterielle Vektoren, die das Nukleokapsidprotein exprimierten (Bankamp, et al., 1991), (Fennelly, et al., 1995), (Fooks, et al., 1995), Ratten und Mäuse gegen eine Masernvirusenzephalitis schützen. Im Enzephalitismodell konnte nachgewiesen werden, daß CD4⁺ T-Zellen alleine ausreichend sind, um gegen eine Enzephalitis zu schützen (Finke, et al., 1994). Im Gegensatz zu Pneumoniemodellen für MV-Infektionen (Baumwollratten und Affen) liegt hier ein deutlicher Unterschied in der protektiven Immunantwort gegen die Infektion des ZNS im Vergleich zu Lunge/Gesamtorganismus vor. Auch im Affenmodell konnte gezeigt werden, daß die Expression des Nukleokapsidproteins über Mykobakterien nicht gegen Masern schützt (Zhu, et al., 1997). Die Ergebnisse im Baumwollratten- und Affenmodell werden durch Daten aus Versuchen mit dem Rinderpestvirus (RPV) in Kühen unterstützt. Hier konnte bestätigt werden, daß eine Immunisierung mit Vakziniavirusrekombinanten, die das Hämagglutinin und Fusionsprotein von Rinderpestvirus exprimierten, neutralisierende Antikörper und Schutz induzieren konnte (Yamanouchi, et al., 1993). Eine Immunisierung mit einem rekombinanten Vakziniavirus, welches das Nukleokapsid exprimierte, konnte hingegen trotz der Induktion von Antikörpern und T-Zellen nicht gegen eine experimentelle Infektion schützen (Ohishi, et al., 1999). Mit Hilfe der DNS-Immunisierung konnte die Bedeutung von MV-neutralisierenden Antikörpern für den Schutz gegen eine respiratorische Infektion mit MV bestätigt werden. Für die Überwindung einer MV-Infektion im Menschen wird hauptsächlich die zelluläre Immunantwort verantwortlich gemacht, da Kinder mit Agammaglobulinämie eine MV-Infektion überwinden können (Bruton, 1953), (Good and Zak, 1956), während Patienten, die an einer T-Zell-Defizienz leiden, schwere, oft letale Verlaufsformen der Masern entwickeln (Katz, 1995). In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß eine T-Zell-Defizienz gleichzeitig eine B-Zell-Defizienz bedingt und daß in einem T-Zell-defizienten Organismus nicht die Bedeutung der humoralen Immunantwort untersucht werden kann. Die Bedeutung MV-neutralisierender Antikörper beim Menschen wird aus der Beobachtung ersichtlich, daß Säuglinge mit hohen Titern an maternalen Antikörpern gegen

MV-Infektionen geschützt sind (Black, 1989), (Halsey, et al., 1985), (Albrecht, et al., 1977) und daß die Gabe von Hyperimmunglobulin bis zu 5 Tage nach der Exposition den Ausbruch der akuten Masern verhindern kann. Der Titer an neutralisierenden Antikörpern ist zudem ein wichtiger Protektionsparameter, der Aufschluß darüber gibt, inwieweit der Organismus vor Reinfektion geschützt ist. Im Baumwollrattenmodell konnte bestätigt werden, daß der passive Transfer von MV-spezifischen Antikörpern Baumwollratten titerabhängig vor intranasaler Infektion mit MV schützt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Impfstudien in Baumwollratten haben gezeigt, daß wie im Menschen neutralisierende Antikörper von entscheidender Bedeutung für einen Schutz gegen eine Infektion mit MV sind.

Mit Hilfe der Plasmidimmunisierung konnte bereits in experimentellen Systemen bei Neonaten und in Gegenwart maternaler Antikörper eine protektive Immunantwort induziert werden (Hasset, et al., 1997), (Wang, et al., 1998). Die genetische Immunisierung bietet den Vorteil, daß der Immunisierungsvektor (Plasmid-DNS) nicht von maternalen Antikörpern erkannt und neutralisiert wird. Allerdings ist eine DNS Immunisierung nicht in allen experimentellen Systemen in Gegenwart maternaler Antikörper erfolgreich (Monteil, et al., 1996), (Le Potier, et al., 1997). Hierbei scheint die Form und die Antigenität, des Plasmid-kodierten Proteins eine wichtige Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, daß ein internes Protein in der Lage war, in Gegenwart maternaler Antikörper eine protektive Immunantwort zu induzieren (Hasset, et al., 1997), während ein Oberflächen-Glykoprotein nicht erfolgreich war (Monteil, et al., 1996). Im Baumwollrattenmodell für maternale Antikörper wurde untersucht, ob Plasmide, die sowohl für ein Oberflächen-Glykoprotein (MV-H) als auch für ein nichtglykosiliertes internes Protein (MV-N) kodieren, in Gegenwart maternaler Antikörper eine Serokonversion induzieren. In der Baumwollratte war diese Form der Immunisierung gegen Masernvirus in Gegenwart maternaler Antikörper, unabhängig von der Form des Antigens, nicht wirksam. Möglicherweise kann durch Optimierung der Vektor DNS (Insertion immunstimulatorischer CpG-Sequenzen) oder durch Koapplikation von Plasmiden, die für Zytokine kodieren eine verstärkte Immunantwort erzielt werden, die auch in Gegenwart maternaler Antikörper effektiv ist. Eine andere Möglichkeit die Effizienz der Plasmidimmunisierung zu verbessern, ist der zielgenaue Plasmidtransfer über Bakterien in APZ. Dazu werden Bakterien (Salmonellen, Listerien) eingesetzt, die dendritische Zellen und Makrophagen infizieren und über einen noch unbekanntem

Mechanismus das Plasmid im Zytoplasma freisetzen (Darji, et al., 1997), (Dietrich, et al., 1998).

Um in Gegenwart maternaler Antikörper eine MV-spezifische und protektive Immunantwort zu induzieren, wurde ein rekombinantes Vesikuläres Stomatitis Virus verwendet (VSV-H), welches das MV-Hämagglutinin in der Hülle von VSV exprimiert. Es konnte gezeigt werden, daß eine intranasale Immunisierung mit VSV-H in Gegenwart maternaler Antikörper zu Vakzine-induzierter Serokonversion und zu Protektion gegen eine experimentelle Infektion mit MV führt. Somit erfüllt VSV-H die wichtigste Anforderung, die an einen neuartigen MV-Impfstoff gestellt wird. Eine weitere Forderung ist, daß ein neuartiger MV-Impfstoff sowohl das MV-H als auch das MV-F Protein exprimieren sollte, um ein mögliches Auftreten von atypischen Masern zu verhindern. Da es mit Hilfe von VSV nicht möglich ist, das MV-Fusionsprotein in höheren Mengen stabil zu exprimieren (Schnell, et al., 1996) und da VSV als Immunisierungsvektor beim Menschen nicht zugelassen ist, ist die Verwendung von VSV-H als neuartiger MV-Impfstoff im Menschen nicht möglich. VSV-H ist aber hervorragend geeignet, um die Mechanismen zu untersuchen, die für eine erfolgreiche Immunisierung in Gegenwart maternaler Antikörper erforderlich sind.

Im Vergleich zu MV besitzt VSV mehrere Vorteile, die es als Immunisierungsvektor interessant machen. VSV-Infektionen induzieren sehr schnell sehr hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern, die gegen das VSV-Glykoprotein gerichtet sind. Aus diesem Grund ist VSV als Immunisierungsvektor für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern prinzipiell sehr gut geeignet. Es ist gezeigt worden, daß für die hohe Immunogenität des VSV-Glykoproteins die polymere Anordnung und die starre, Gewehrkegel-artige Hülle von VSV verantwortlich ist (Bachmann, et al., 1997). Nach Insertion von einem fremden Glykoprotein (Influenza A Virus Hämagglutinin) wurde auch gegen dieses Protein eine hochtitrige Antikörperantwort generiert (Roberts, et al., 1998). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß VSV-H sehr hohe Titer an MV-neutralisierenden Antikörpern induzierte, die höher waren als nach Immunisierung mit MV selbst. Da das MV-Hämagglutinin als zusätzliches Protein in der Hülle von VSV exprimiert wird und keine Funktion bei der Virusreplikation besitzt, kann es *in vitro* und *in vivo*, im Gegensatz zu MV, nicht durch maternale Antikörper neutralisiert werden und auch in Gegenwart maternaler Antikörper MV-neutralisierende Antikörper und Schutz induzieren. Unter

Verwendung einer Spaltvakzine, wie VSV-H, die nicht die beiden Glykoproteine F und H gleichzeitig exprimiert, ist es möglich hohe Immunisierungsdosen zu verwenden und in Gegenwart maternaler Antikörper eine starke MV-spezifische Immunantwort zu induzieren. Eine Erhöhung der Immunisierungsdosis ist für eine Immunisierung mit dem derzeitigen MV-Impfstoff nicht möglich. Es konnte zwar bestätigt werden, daß eine zehnfach erhöhte Immunisierungsdosis zu einer verbesserten Vakzine-induzierten Serokonversion bei 4 bis 6 Monate alten Kleinkindern führte, allerdings traten häufig bei Mädchen tödlich verlaufende Infektionskrankheiten auf, so daß diese Form der Immunisierung in Gegenwart maternaler Antikörper wieder aufgegeben wurde (Aaby, et al., 1993), (Halsey, et al., 1993). Für die erhöhte Empfänglichkeit gegenüber opportunistischen Infektionen wird die MV-induzierte Immunsuppression verantwortlich gemacht, die aufgrund der höheren Immunisierungsdosis stärker zum Tragen kommt. Da die viralen Glykoproteine F und H gleichzeitig von infizierten Zellen exprimiert werden müssen, um eine Immunsuppression zu induzieren (Niewiesk, et al., 1997), (Schlender, et al., 1996), liegt hier der Vorteil von Spaltvakzinen, die nicht die beiden Glykoproteine gleichzeitig exprimieren.

Eine Immunisierung mit replikations-defizientem VSV-H (UV-inaktiviert) führte nicht zur Induktion von MV-spezifischen Antikörpern und zu Schutz. Daraus wurde geschlossen, daß die alleinige Proteinexpression des MV-H in polymerer Form in der rigiden Hülle von VSV nicht ausreicht, um eine starke MV-spezifische Immunantwort zu induzieren, vielmehr ist es wichtig, daß der Immunisierungsvektor *in vivo* replizieren kann. Diese These wird durch die Beobachtung gestärkt, daß der Immunisierungserfolg nach Immunisierung mit VSV-H Deletionsmutanten (CT 9-H und CT 1-H) abhängig ist von der Replikationsgeschwindigkeit der jeweiligen Mutanten. Die Mutante CT 9-H, die nur eine geringfügig verminderte Replikationsgeschwindigkeit als VSV-H aufweist, induzierte in Gegenwart maternaler Antikörper eine vergleichbare Immunantwort als VSV-H. Eine Immunisierung mit der Mutanten CT 1-H, die eine deutlich verminderte Replikationsgeschwindigkeit aufweist, führte hingegen in Anwesenheit maternaler Antikörper nicht zur Induktion von MV-neutralisierenden Antikörpern und zu Protektion. Ein sehr wichtiger Punkt bei der Immunisierung in Gegenwart maternaler Antikörper ist die Qualität der induzierten Immunantwort. Beim Menschen waren Immunisierungen in Gegenwart maternaler Antikörper bisher nur gegen Poliovirus- (zur Übersicht (Melnick, 1996)) und gegen Rotavirus-Infektionen (Perez-Schael, et al., 1997) erfolgreich. In beiden

Fällen wurde eine mukosale Immunantwort induziert. Eine intranasale Immunisierung mit VSV-H induziert ebenfalls eine mukosale Immunantwort. Interessant war die Beobachtung, daß VSV-H nur nach intranasaler und nicht nach intraperitonealer Immunisierung in Gegenwart maternaler Antikörper zu Serokonversion und Schutz führte, während VSV-H in Abwesenheit maternaler Antikörper sowohl nach intranasaler als auch nach intraperitonealer Immunisierung hohe Titer an MV-spezifischen Antikörpern induzierte. Eine mögliche Erklärung, weshalb nur an mukosalen Oberflächen eine Immunisierung in Gegenwart maternaler Antikörper erfolgreich ist, könnte sein, daß in den passiv transferierten natürlichen maternalen Antikörpern bzw. in dem humanen Antiserum keine gegen proteolytischen Abbau auf den Schleimhäuten resistente IgA-Dimere vorliegen. Sekretorische IgA-Dimere werden nur nach aktiver Immunisierung induziert. Nach intraperitonealer Immunisierung mit VSV-H in Gegenwart maternaler Antikörper können passiv transferierte MV-spezifische IgG und IgM Antikörper VSV-H binden und über ihren Fc-Rezeptor eine B-Zell Toleranz induzieren. Nach Diffusion auf mukosale Oberflächen werden MV-spezifische IgM und IgG-Antikörper abgebaut. Da zudem keine gegen proteolytischen Abbau resistente IgA Antikörper auf den Schleimhäuten vorliegen, könnte das eine Erklärung sein, wie VSV-H nach intranasaler Immunisierung MV-neutralisierende Antikörper und Protektion induzieren kann. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, daß an den inneren Schleimhäuten eine hohe Dichte an B-Zellen vorliegt und sich hier möglicherweise eine B-Zellantwort leichter stimulieren läßt.

Mit Hilfe von VSV-H konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, daß die Induktion einer MV-spezifischen Immunantwort in Gegenwart maternaler Antikörper nach Immunisierung an mukosalen Oberflächen möglich ist. Eine sehr einfache und bewährte Art eine mukosale Immunantwort zu induzieren ist die sog. "Schluck-Impfung" bzw. die orale Verabreichung eines Impfstoffs. Eine neuartige Form über den Gastrointestinaltrakt zu immunisieren, ist die Verwendung von transgenen Pflanzen. Es ist gelungen, virale Proteine von z. B. Kartoffeln und Spinat exprimieren zu lassen und die orale Aufnahme hat im Tiermodell zu Antikörperantworten und auch zu Schutz gegen Infektion geführt (Arakawa, et al., 1998), (Modelska, et al., 1998). Möglicherweise könnte über die Nahrungsaufnahme von MV-transgenen Pflanzen eine MV-spezifische und protektive Immunantwort in Anwesenheit maternaler Antikörper induziert werden. Ein großer Vorteil dieser Immunisierungsform ist es, daß eine Mehrfachimmunisierung mit dieser Methode kein Problem darstellen würde. Durch die Nahrungsaufnahme von MV-transgenen

Pflanzen über einen längeren Zeitraum könnte eine ständige Antigenfreisetzung an mukosalen Oberflächen erreicht und so spätestens nach Absinken der Titer an maternalen Antikörpern eine erfolgreiche Immunisierung induziert werden.

6. Zusammenfassung

Trotz der Existenz einer Lebendvakzine gegen Masernvirusinfektionen erkranken jährlich 30-40 Millionen Menschen an Masern und mehr als 1 Million versterben daran. Besonders Kleinkinder besitzen innerhalb des ersten Lebensjahres ein hohes Risiko an Masern zu erkranken und der Anteil an schweren Krankheitsverläufen mit letalem Ausgang ist in dieser Altersgruppe besonders hoch. Aus diesem Grund wäre es sehr wichtig, wenn man Säuglinge bereits in den ersten Lebensmonaten erfolgreich immunisieren könnte. Da eine Immunisierung mit dem derzeitigen MV-Impfstoff in den ersten Lebensmonaten durch maternale MV-spezifische Antikörper inhibiert wird, hat die WHO dazu aufgerufen neuartige Impfstoffe zu entwickeln, die in Gegenwart maternaler Antikörper effektiv sind. Zur Entwicklung und Erprobung von alternativen Impfstoffen in Gegenwart maternaler Antikörper konnte bislang nur das Affenmodell benutzt werden, welches durch das geringe Angebot an Tieren und aus praktischen Gründen nur beschränkt einsetzbar ist. In der hier vorgestellten Dissertation wurde gezeigt, daß Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) alternativ zum Affen ein hervorragendes Tiermodell sind, um die Immunogenität potentieller Impfstoffvektoren und ihre Effektivität in Gegenwart maternaler Antikörper zu testen. Baumwollratten sind das einzige Nagetiermodell, in dem das Masernvirus wie beim Menschen im Respirationstrakt replizieren und auch in der Peripherie nachgewiesen werden kann. Nach Immunisierung mit MV-Impfstämmen entwickeln Baumwollratten wie der Mensch eine MV-spezifische Immunantwort und sind gegen eine anschließende Infektion mit MV-Wildtypstämmen geschützt. Um zu überprüfen, ob maternale Antikörper wie bei Säuglingen auch bei Baumwollratten die Vakzine-induzierte Serokonversion inhibieren, wurden zwei Modellsysteme für maternale Antikörper entwickelt. MV-immune Weibchen übertragen MV-spezifische maternale Antikörper auf ihre Jungtiere und stellen ein Modell für natürliche maternale Antikörper dar. Im zweiten Modell können nach Injektion eines humanen MV-spezifischen Serums in Baumwollratten maternale Antikörper simuliert werden. Die Vakzine-induzierte Serokonversion wurde sowohl durch natürliche maternale Antikörper, als auch durch passiv transferierte humane MV-spezifische Antikörper inhibiert. Die Verwendung eines heterologen Serums als Modell für

maternale Antikörper bietet drei Vorteile: die Gabe von Humanserum ist gut reproduzierbar, humane MV-spezifische Antikörper werden schneller abgebaut, als natürliche maternale Antikörper und passiv transferierte ("maternale") Antikörper können im ELISA von aktiv induzierten Antikörpern unterschieden werden.

Mit Hilfe der DNS-Immunisierung konnte gezeigt werden, daß das MV-Hämagglutinin, das Fusionsprotein und das Nukleokapsidprotein (MV-Hauptantigene) in der Baumwollratte MV-spezifische Antikörper und eine MV-spezifische T-Zellantwort induzieren. Aber nur die beiden Glykoproteine F und H konnten im Gegensatz zum Nukleokapsidprotein MV-neutralisierende Antikörper induzieren und gegen eine Infektion des Respirationstraktes schützen. In Gegenwart maternaler Antikörper führte diese Form der Immunisierung nicht zu einer Vakzine-induzierten Serokonversion und zu Protektion.

Um in Gegenwart maternaler Antikörper MV-neutralisierende Antikörper und Schutz gegen eine Infektion mit MV zu induzieren, wurde ein rekombinantes vesikuläres Stomatitis Virus (VSV-H) verwendet, welches das MV-Hämagglutinin (Hauptantigen für MV-neutralisierende Antikörper) in der Hülle von VSV exprimiert. Eine alternative MV-Vakzine muß die beiden MV-Glykoproteine (Hämagglutinin- und Fusionsprotein) enthalten, da sie sonst die atypischen Masern (eine schwere Verlaufsform der akuten Masern) in immunisierten Individuen nach Infektion mit dem Wildtypvirus induzieren kann. Da VSV das Fusionsprotein nicht stabil exprimiert, kann VSV nicht als Impfvektor bei Patienten eingesetzt werden. Im Baumwollrattensystem ließen sich mit diesem Vektorsystem jedoch wichtige Untersuchungen zur Immunisierung in Gegenwart maternaler Antikörper durchführen. Das MV-Hämagglutinin ist als zusätzliches Protein ("passenger protein") in die Hüllmembran von VSV inkorporiert und hat keine funktionelle Bedeutung für die virale Replikation. *In vitro* konnte gezeigt werden, daß VSV-H im Gegensatz zu MV durch MV-spezifische Antikörper nicht neutralisiert werden kann. Eine Immunisierung mit VSV-H induzierte sehr schnell hohe Titer an MV-neutralisierenden Antikörpern, die höher waren als nach Immunisierung mit MV. *In vivo* konnte bestätigt werden, daß VSV-H durch maternale Antikörper nicht neutralisiert wird und auch in Gegenwart maternaler Antikörper MV-neutralisierende Antikörper und Schutz gegen eine respiratorische MV-Infektion induziert. Hierbei ist die Stimulation des mukosalen Immunsystems sehr wichtig, da VSV-H nur nach intranasaler und nicht nach intraperitonealer Immunisierung maternale Antikörper umgehen kann. Die Replikationsfähigkeit von VSV-H ist ebenfalls essentiell, da Immunisierungsversuche mit

UV-inaktiviertem VSV-H bzw. mit VSV-H Deletionsmutanten, die eine stark verminderte Replikationsfähigkeit aufweisen, nicht zu Vakzine-induzierter Serokonversion und zu Schutz in Gegenwart maternalen Antikörper führten. An alternative Vektorsysteme muß deshalb die Forderung gestellt werden, daß sie das Schleimhaut-assoziierte Immunsystem stimulieren, Masernvirusproteine als akzessorische Proteine exprimieren und eine gewisse Restvirulenz aufweisen. Für die Untersuchung derartiger Vakzine-Kandidaten auf die Induktion der Serokonversion in Gegenwart maternalen Antikörper und Schutz gegen MV Infektion ist das Baumwollrattenmodell hervorragend geeignet.

7. Summary

Although measles vaccination with an attenuated live vaccine has proven to be successful, forty million cases of measles continue to occur annually worldwide, of which more than one million are fatal. Especially infants in the first year of life are at high risk for measles virus (MV) infection and MV associated mortality is very high in this age group. For this reason it would be desirable to be able to immunize infants in the first year of life. As immunization of infants with the current MV-vaccine is inhibited by the presence of maternal MV-specific antibodies, the World Health Organization (WHO) has called to develop alternative MV vaccines which are effective in the presence of maternal antibodies. For the development and testing of vaccine candidates rhesus macaques were so far the only animal model. Due to the restricted availability of monkeys and due to practical reasons we have set up a cotton rat animal model for MV-infections in which we could test the immunogenicity of new MV vaccines and evaluate their efficiency in the presence of maternal antibodies. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) are the only rodents in which MV replicates in the respiratory tract after intranasal infection. After immunization with MV vaccine strains cotton rats develop a MV-specific immune response and are protected against challenge with MV wildtype strains. To investigate whether maternal antibodies inhibit vaccine-induced seroconversion in cotton rats we have developed two models for maternal antibodies in cotton rats. MV immune dams transmit MV specific maternal antibodies to their offspring and represent a model for natural maternal antibodies. In a second model we use a human MV specific serum to simulate maternal

antibodies. Vaccine-induced seroconversion is efficiently inhibited in both models. The use of a heterologous serum as model for maternal antibodies offers three advantages: the transfer of human serum is well reproducible, human MV specific antibodies decline more rapidly than natural maternal antibodies and the use of a human serum allows us to differentiate between passively transferred human antibodies ("maternal antibodies") and actively generated cotton rat antibodies by ELISA.

By DNA immunization we could show that plasmids expressing the MV hemagglutinin-, the MV fusion- and the MV nucleocapsid protein induced MV specific antibodies and MV specific T cell response. In contrast to the nucleocapsid protein the two glycoproteins F and H induced MV neutralizing antibodies and gave full protection against MV infection of the respiratory tract. In the presence of maternal antibodies plasmid immunization doesn't result in vaccine-induced seroconversion and protection against respiratory infection with MV.

To induce MV neutralizing antibodies and protection against MV infection we have used a recombinant vesicular stomatitis virus (VSV-H) expressing the MV hemagglutinin (major target antigen for the induction of MV neutralizing antibodies). An alternative MV vaccine has to express both the MV hemagglutinin and the MV fusionprotein. Otherwise atypical measles (a severe form of acute measles) may occur in immunized individuals after infection with wildtyp measles virus. With the VSV expression system it was not possible to stably express the MV fusionprotein. For this reason it is not possible to use VSV as immunization vector in humans. Using VSV-H in the cotton rat animal model for maternal antibodies we were able to investigate the problem of immunization in the presence of maternal antibodies. In the recombinant VSV-H the MV hemagglutinin is incorporated as passenger protein in the bullet-shaped envelope of VSV and the MV hemagglutinin has no functional relevance in viral replication. *In vitro* we could show that VSV-H is in contrary to MV not neutralized by MV specific antibodies. Immunization with VSV-H induced very fast high titers of MV neutralizing antibodies that were even higher than after immunization with MV. *In vivo* we could confirm that VSV-H is not neutralized by maternal antibodies and that VSV-H is able to induce MV neutralizing antibodies and protection in the presence of maternal antibodies. To overcome maternal antibodies it is essential to stimulate the mucosal immune system as VSV-H is able to circumvent maternal antibodies after intranasal immunization whereas after intraperitoneal immunization it is not. The use of replication competent virus is also essential as

immunization with UV-inactivated VSV-H or immunization with VSV-H deletion mutants with highly reduced replication capability doesn't result in seroconversion and protection in the presence of maternal antibodies. Our data demonstrate that alternative MV vaccine vectors should stimulate the mucosa-associated immune system, express MV proteins as passenger proteins and retain a certain virulence. To investigate the ability of vaccine vectors to induce seroconversion and protection in the presence of maternal antibodies the cotton rat is a well suited animal model.

8. Literaturverzeichnis

- Aaby, P., et al., Long-term survival after Edmonston-Zagreb measles vaccination in Guinea-Bissau: increased female mortality rate. *J. Pediatr.* 1993. 122: p. 904-908.
- Aaby, P., Jenson, T. G., Hansen, H. L., Kristiansen, H., Thaarup, J., Poulsen, A., Sodemann, M., Jakobsen, M., Knudsen, K., da Silva, M. C. and Whittle, H. Trial of high-dose Edmonston Zagreb measles vaccine in Guinea-Bissau: Protective efficacy. *Lancet.* 1988. 2: p. 809.
- Akbari, O., Panjawani, N., Garcia, S., Tascon, R., Lowrie, D. and Stockinger, B. DNA Vaccination: Transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J. Exp. Med.* 1999. 189 (1): p. 169-177.
- Albrecht, P. Ennis, F. A., et al. Persistence of maternal antibodies beyond 12 months a mechanism of measles vaccine failure. *J. Pediatr.* 1977. 91: p. 715-718.
- Anthony R. Fooks, Dharshini Jeevarajah, John Lee, Alan Warnes, Stefan Niewiesk, Volker ter Meulen, John R. Stephenson and Christopher S. Clegg. Oral or parenteral administration of replication-deficient adenoviruses expressing the measles virus proteins: protective immune responses in rodents. *J. Gen. Virol.* 1998. 79: p. 1027-1031.
- Arakawa, T., D.K. Chong, and W.H. Langridge. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat. Biotechnol.* 1998. 16: p. 292-297.
- Bachmann, M.F. and Zinkernagel, R.M. The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. *Viewpoint immunology today.* 1996. 17(12): p. 553-558.
- Bankamp, B., Brinckmann, U. G., Reich, A., Niewiesk, S., ter Meulen, V. and Liebert, U. G. Measles virus nucleocapsid protein protects rats from encephalitis. *J. Virol.* 1991. 65: p. 1695-1700.
- Bartz, R., Firsching, R., Rima, B. K., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J. Differential receptor usage by Measles virus strains. *J. Gen. Virol.* 1998. 79: p. 1015-1025.
- Björkholm, B., Granström, M., Taranger, J., Wahl, M. and Hageberg, L. Influence of high titers of maternal antibody on the serologic response of infants to diphtheria vaccination at three, five and twelve months of age. *Ped. Infect. Dis. J.* 1995. 14: p. 846-850.
- Black, F.L. und Rosen, L. (1962). Patterns of measles antibodies in residents of Tahiti and their stability in the absence of re-exposure. *J. Immunol.* 88, 725.
- Black, F. L., Berman, L. L., Borgono, J. M., et al. Geographic variation in infant loss of maternal measles antibody and in prevalence of rubella antibody. *Am. J. Epidemiol.* 1986. 124: p. 442-452.
- Black, F. L. Measles active and passive immunity in a worldwide perspective. *Prog. Med. Virol.* 1989. 36: p. 1-33.

Brinckmann, U. G., Bankamp, B., Reich, A., ter Meulen, V. and Liebert, U. G. Efficacy of single measles virus structural proteins in the protection of rats from measles encephalitis. *J. Gen. Virol.* 1991. 72: p. 2491-2500.

Bruton, O. C. Agammaglobulinemia. *Pediatrics.* 1953. 9: p. 722-728.

Buckland, R. und Wild, T.F. Is CD46 the cellular receptor for measles virus ? *Virus Res.* 1997. 48: p. 1-9.

Burnstein, T., Jensen, J. H. and Waksman, B. H. The development of a neurotropic strain of measles virus in hamsters and mice. *J. Infect. Dis.* 1963. p. 113: 265-272.

Cardoso, A. I., Sixt, N., Vallier, A., Fayolle, J., Buckland, R. and Wild, T. F. Measles virus DNA vaccination: antibody isotype is determined by the method of immunization and by the nature of both antigen and the coimmunized antigen. *J. Virol.* 1998. 72: p. 2516-2518.

Carter, M.J. und ter Meulen, V. 1987. Measles. in Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E. und Pattison, J.R., eds.: principles and practice of clinical virology. 291.

Castaneda, S. J., Wong, T. C.: Leader sequence distinguishes between translatable and encapsidated Measles virus RNAs. *J. Virol.* 1990. 64: p. 222-230.

Chen, T., Markowitz, L. E., Albrecht, P., Steward, A., Mofenson, L.M., Preblut, R. and Orenstein W.A. Measles antibody: Reevaluation of protective Titers. 1990. *J. of Infect. Dis.* 1990. 162: p. 1036-1042.

Cherry, J.D. (1987): Viral infections: measles; in Feigin, R.D., Cherry, J.D., eds.: *Textbook of Pediatric Infectious Disease, Vol. 2*, Saunders, Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, 1607.

Clements, C. J., and F. T. Cutts. The epidemiology of measles: thirty years of vaccination. In *Measles virus*, eds. V. ter Meulen and M. A. Billeter. 13-34. 191. Berlin: Springer Verlag, 1995.

Cohen, J. Vaccine studies stymied by shortage of animals. *Science.* 2000. 287: p. 959-960.

Crowe, J. E., Collins, P. L., Chanock, R. M., Murphy, B. R. Vaccines against respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. In: Levine, M. M., Woodrow, G. C., Karper, J. B., Cobon, G. S., eds. *New Generation Vaccines*. Second ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997.: p. 711-725.

Cutts, C. T., Clements, C. J., Bennett J. V. Alternative routes of measles immunisation: a review. *Biologicals.* 1997. 25 (3): p. 323-328.

D'Ambrosio, D., et al. Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by FCgRIIB1. *Science.* 1995. 268: p. 293-297.

Darji, A., et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell.* 1997. 91: p. 765-775.

- De Serres, G., Joly, J. R., Fauvel, M., Meyer, F., Masse, B. and Boulianne, N. Passive immunity against measles during the first 8 months of life of infants born to vaccinated mothers or to mothers who sustained measles. *Vaccine*. 1997. 15(6/7): p. 620-623.
- Dietrich, G., Bubert, A., Gentchev, I., Sokolovic, Z., Simm, A., Catic, A., Kaufmann, S. H. E., Hess, J., Szalay, A. A. and Goebel, W. Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat. Biotech.* 1998. 16: 181-186.
- Dörig, R. E., Marcil, A., Chopra, A. und Richardson, C. D. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell*. 1993. 75: p. 295-303.
- Duclos, P. and Ward, B. J. Measles vaccines. A review of adverse events. *Drug Safety*. 1998. 6: p. 435-454.
- Edmonson, M., Addis, D., McPherson, J., Berg, J., Circo, S., and Davis, J. Mild measles and secondary vaccine failure during a sustained outbreak in a highly vaccinated population. *J. Am. Med. Assoc.* 1990. 163: p. 2467-2471.
- Enders, J.F. and T.C. Peebles. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1954. 86: p. 277-286.
- Englund, J. A., Anderson, E. L., Reed, G., Decker, M. D., Edwards, K. M., Pichichero, M.E. Steinhoff, M. C., Rennels, M. B., Deforest, A. and Maede, B. The effect of maternal antibody on serologic response and the incidence of adverse reactions after primary immunization with a cellular and whole-cell pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids. *Pediatrics*. 1995. 96 (suppl): p. 580-584.
- Engvall, E und Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin G. *Immunochem.* 1971. 8: p. 871-875.
- Faith, R. E., Montgomery, C. A., Durfee, W. J., Aguilar-Cordova, E. and Wyde, P. R. The cotton rat in biomedical research. *Lab. Animal Science*. 1997. 47: p. 337-345.
- Fennelly, G. J., Flynn, J. A. L., ter Meulen, V., Liebert, U. G. and Bloom, B. R. Recombinant Bacille Calmette Guerin priming against measles. *J. Infect. Dis.* 1995. 172: p. 698-705.
- Fennelly, G. J., Khan, S. A., Abadi, M. A., Wild, T. F. and Bloom, B. R. Mucosal DNA vaccine immunization against measles with a highly attenuated *Shigella flexneri* vector. *J. Immunol.* 1999. 162: p. 1603-1610.
- Finke, D. and U.G. Liebert. CD4+ T cells are essential in overcoming experimental murine measles encephalitis. *Immunology*. 1994. 83: p. 184-189.
- Fooks, A. R., Jeevarajah, D., Warnes, A., Wilkinson, G. W. G. and Clegg, J. C. S. Immunization of mice with plasmid DNA expressing the measles virus nucleocapsidprotein gene. *Viral Immunol.* 1996. 9: p. 65-71.
- Forger, J. M., Bronson, A. S., Huang, A. S. and Relsa, C.S. Murine infection by vesicular stomatitis virus: initial characterisation of the H-2^d system. *J. Virol.* 1991. 65: p. 4950-4958.

Francisco, A., Hall, A.J., Unicomb, L., Chakraborty, J. Yunus, M.D. and Sack, R.B. Maternal measles antibody decay in rural Bangladeshi infants-implications for vaccination schedules. *Vaccine*. 1998. 16(6): p. 564-568.

Giraudon, P. und Wild, T.F. Correlation between epitopes on hemagglutinin of measles virus and biological activities. Passive protection by monoklonal antibodies is related to their hemagglutination inhibiting activity. *Virology*. 1985. 144: p. 46.

Good, R. A., S. J. Zak. Disturbances in gamma globulin synthesis as „experiments of nature“. *Pediatrics*. 1956. 18: p. 109 - 149.

Griffin, D. E., Mullinx, J., Narayan, O. and Johnson, R. T. Age dependence of viral expression: comparative pathogenesis of two rodent-adapted strains of measles virus in mice. *Infect. Immun.* 1974. 9: p. 690-695.

Griffin, D.E., Ward, B.J., Johnson, R.T., Jauregui, E. und Vaisberg, A. Immune activation in measles. *N. Engl. J. Med.* 1989. 320: p. 1667-1672.

Griffin, D.E., Ward, B.J., et al. Immune activation during measles: Interferon-gamma and neopterin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease. *J. Infect. Dis.* 1990. 161: p. 1170-1173.

Griffin, D.E., Ward, B.J., et al. Immune activation during measles: Beta-2-microglobulin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease. *J. Infect. Dis.* 1992. 166: p. 1170-1173.

Griffin, D.E. und Ward, B.J. Differential CD4 T cell activation in measles. *J. Inf. Dis.* 1993. 168: p. 275.

Griffin, D. E. 1995. Immune response during measles virus infection. *Measles Virus*, Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, ter Meulen, V., Billeter, M. A., Eds., p. 118 - 130.

Griffin, D. E., Bellini, W. J.: Measles virus. In: Fields, B. N., Knipe, P. M., Howley, P. M., et al., (eds), *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996. p. 1267-1311.

Halsey, N. A., Boulos, R. et al. Response to measles vaccine in Haitian infants 6 to 12 months of age. *N. Engl. J. Med.* 1985. 313: p. 544-549.

Halsey, N. Increased mortality following high titer measles vaccines: too much good thing. *J. Pediatr. Infect. Dis.* 1993. 12: p. 462-465.

Harte, P. G. and Playfair, J. H. L. Failure of malaria vaccination in mice born to immune mothers. II. Induction of specific suppressor cells by maternal IgG. *Clin. Exp. Immunol.* 1983. 51: p. 157-164.

Hasset, D.E., J. Zhang, and J.L. Whitton. Neonatal DNA immunization with a plasmid encoding an internal viral protein is effective in the presence of maternal antibodies and protects against subsequent viral challenge. *J. Virol.* 1997. 71: p. 7881-7888.

Huber, M., Cattano, R., Spielhofer, P., Örvell, C., Norrby, E., Messerli, M., Perriard J.C., Billiter M.A. Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm. *Virology*. 1991. 18: p. 299-308.

Illonen, J., Makela, M. J., et al. Cloning of human T cells specific for measles virus hemagglutinin and nucleocapsid. *Clin. Exp. Immunol.* 1990. 81: p. 212-217.

Jacobson, S., R. P. Sekaly, C. L. Jacobson, H. McFarland, E. O. Long. HLA class II-restricted presentation of cytoplasmic measles virus antigens to cytotoxic T cells. *J. Virol.* 1989. 63: p. 1756 - 1762.

Jaye, A., Magnusen, A. F. and Whittle, H. C. Human leukocyte antigen class I- and class II-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to measles antigens in immune adults. *J. Infect. Dis.* 1998. 177: p. 1282-1289.

Katz, M. Clinical spectrum of measles, in *Measles virus*, M. Billeter and V. ter Meulen, Editors. 1995. Springer: Berlin. p. 1-12.

Kobune, F., Takahashi, H., Terao, K., Ohkawa, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Sakata, H., Yamanouchi, K. and Kai, C. Nonhuman primate models of measles. *Lab. Animal Sci.* 1996. 46: p. 315-320.

Koprowski, H. and Weiner, D. B. DNA vaccination/genetic vaccination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1998. 226:V-XIII.

Kreth, H.W., V. ter Meulen, G. Eckert. 1979. Demonstration of HLA restricted killer cells in patients with acute measles. *Med. Microbiol. Immunol.* 165: 203 - 214.

Krieg, A. M., Yi, A. K., Schoor, J. and Davis, H. L. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol.* 1998. 6: p. 23-27.

Lamb, R. A.: Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology*. 1993. 197: p. 1-11.

Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A. and Rose, J. K. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995. 92: p. 4477-4481.

Le Potier, M.F., et al. Study of the delivery of the gD gene of pseudorabies virus to one-day-old piglets by adenovirus or plasmid DNA as ways to by-pass the inhibition of immune responses by colostral antibodies. *Vet. Microbiol.* 1997. 55: p. 75-80.

Lecouturier, V., Fayoll, J., Caballero, M., Corabana, S., Celma, M.J., Fernandez-Munoz, R., Wild, T.F. und Buckland, R. Identification of two amino acids in the H-glycoprotein of measlesvirus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wildtype MV-strains. *J. Virol.* 1996. 70: p. 4200-4204.

Liebert, U. G. and ter Meulen, V. Virological aspects of measles virus-induced encephalomyelitis in Lewis and BN rats. *J. Gen. Virol.* 1987. 68: p. 1715-1722.

- Liszewski, M.K., Post, T.W. und Atkinson J.P. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest members of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu. Rev. Immunol.* 1991. 9: p. 431-455.
- Lund, G. A., Tyrrell, D. L. J., Bradley, R. D., Scraba, D. G. The molecular length of Measles virus RNA and the structural organisation of Measles nucleocapsids. *J. Gen. Virol.* 1984. 65: p. 1535-1542.
- Maldonado, Y. A., Lawrence, C., DeHovitz, R., Hartzell, H., and Albrecht, P. Early loss of passive measles antibody in infants of mothers with vaccine-induced immunity. *Pediatrics.* 1995. 96 (3): p. 447-450.
- Malvoisin, E. und Wild, T.F. Contribution of measles virus fusion protein in protective immunity: anti-F-antibodies neutralize virus infectivity and protect mice against challenge. *J. Virol.* 1990. 64: p. 5160.
- Markowitz, L. E., Albrecht, P., Rhodes, P., Demonteverde, R., Swint, E., Maes, E. F., Powel, C., Patriarca, P. and the Kaiser Permanente Measles Vaccine Trial Team. Changing levels of measles antibody titers in women and children in the United States: Impact on response to vaccination. *Pediatrics.* 1996. 97(1): p. 53-58.
- Martinez, X., Brandt, C., Saddallah, F., Tougne, C., Barrios, C., Wild, F., Dougan, G., Lambert, P. H. and Siegrist, C. A. DNA immunization circumvents deficient induction of T helper type 1 and cytotoxic T lymphocyte responses in neonates and during early life. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. 94: p. 8726-8731.
- Melnick, J. L. Enteroviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E., eds. *Fields Virology*. Vol. 1. Philadelphia: Lippencott-Raven publishers. 1996. p. 655-712.
- Merz, D.C., Scheid, A. und Choppin, P.W. Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection. *J. Exp. Med.* 1980. 151: p. 275.
- Millan, C. L., Weeratna, R., Krieg, A. M., Siegrist, C. A. and Davis, H. L. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. 95: p. 15553-15558.
- Miller, C. Live measles vaccine: a 21 years follow up. *Br. Med. J.* 1987. 295: p. 22-24.
- Modelska, A., et al. Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. 95: p. 2481-2485.
- Monteil, M., et al. Genetic immunization of seronegative one-day-old piglets against pseudorabies induces neutralizing antibodies but not protection and is ineffective in piglets from immune dams. *Vet. Res.* 1996. 27: p. 443-452.
- Murphy-BR; Hall-SL; Kulkarni-AB; Crowe-JE Jr; Collins-PL; Connors-M; Karron-RA; Chanock-RM . An update on approaches to the development of respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccines. *Virus-Res.* 1994 Apr; 32(1): 13-36.

Nanan, R., C. Carstens, H. W. Kreth. Demonstration of virus-specific CD8⁺ T cells in measles-seropositive individuals by in vitro peptide stimulation. *Clin. Exp. Immunol.* 1995. 102: p. 40 - 45.

Niewiesk, S. and Germann, P. G. Development of neutralizing antibodies correlates with resolution of interstitial pneumonia after measles virus infection in cotton rats. *J. Exp. Anim. Sci.* 2000. 40: p. 201-210.

Norrby, E. and Y. Gollmar. Appearance and persistence of antibodies against different virus components after regular measles virus infections. *Infect. Immun.* 1972. 6: p. 240 - 247.

Norrby, E., Enders-Ruckle, G. und ter Meulen, V. Differences in the appearance of antibodies to structural components of measles virus after immunization with inactivated and live virus. *J. Inf. Dis.* 1975. 132: p. 262.

Nussbaum, O., Broder, C. C., Moss, B., Stern, L. B., Rozenblatt, S. and Berger, E. A. Functional and structural interactions between measles virus hemagglutinin and CD46. *J. Virol.* 1995. 69: p. 3341-3349.

Ohishi, K., et al. Cell-mediated immune responses in cattle vaccinated with a vaccinia virus recombinant expressing the nucleocapsid protein of rinderpest virus. *J. Gen. Virol.* 1999. 80: p. 1627-1634.

Panum, P. Observations made during the epidemic of measles on the Faroe Islands in the 1846. 1938. *Med Class* 3: p. 829-886.

Pederson, I. R., Mardhorst, C. H., Gilkmann, G. von Magnus, H. Subclinical measles virus infection in vaccinated seropositive individuals in arctic Greenland. *Vaccine.* 1989. 7: p. 345-348.

Perez-Schael, I., Guntinas, M. J., Perez, M., Pagone, V. Rojjas, A. M., Gonzalez, R., Cunto, W., Hoshino, Y. and Kapikian A. Z. Efficacy of rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N. Engl. J. Med.* 1997. 337: p. 1181-1187.

Polack, F. P., Auwaerter, P. G., Lee, S.-H., Nousari, H. C., Valsamakis, A., Leiferman, K. M., Diwan, A., Adams, R. J. and Griffin, D. E. Production of atypical measles in rhesus macaques: evidence for disease mediated by immune complex formation and eosinophils in the presence of fusion-inhibiting antibody. *Nat. Med.* 1999. 5: p. 629-634.

Preblud, S.R. und Katz, S.L. Measles vaccine. In: Plotkin, S.A., Mortimer, E.A. Jr., eds. *Vaccines.* 1988. Philadelphia: W.B. Saunders.

Prince, G.A. The cotton rat in biomedical research. *AWIC Newsletter*, 1994. 5(2): p. 3-5.

Reed, L.J. and Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am.J.Hygiene.* 1938. 27: p. 493-497.

Richardson, C., Hull, D., Greer, P., Hasel, K., Berkovich, A., Englund, G., Bellini, W., Rima, B., Lazzarini, R. The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of Measles virus (edmonston strain): a comparison of fusion proteins from several different paramyxoviruses. *Virology.* 1986. 155: p. 508-523.

Rima, B.K. Molecular and biological basis of measles strain differences. In: Kurstak, E. (ed.), *Measles and Poliomyelitis*, Springer-Verlag, 1993. Berlin

Roberts, A., Kretzschmar, E., Perkins, A.S., Forman, J., Price, R., Buonocore, L., Kawaoka, Y. and Rose, J.K. Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an Influenza virus hemagglutinin provides complete protection from Influenza virus challenge. *J. Virol.* 1998. 72(6): p. 02-09.

Schlender, J., Schnorr, J. J., Cattomen, T., Cattaneo, R., Billeter, M. A., Ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S. Surface interaction of measles virus glycoproteins is necessary and sufficient for the induction of proliferative inhibition of human peripheral blood mononuclear cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. 93: p. 13194-13199.

Schneider-Schaulies, J., Dunster, L.M., Schwartz-Albiez, R., Krohne, G. und ter Meulen, V. Physical association of moesin and CD46 as a receptor complex for measles virus. *J. Virol.* 1995. 69: p. 2248-2256.

Schnell, M.J., Buonocore, L., Kretzschmar, E., Johnson, E. and Rose, J.K. Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. 93: p. 11359-11365.

Schnell, M.J., Buonocore, L., Boritz, E., Ghosh, H.P., Chernish, R. and Rose, J.K. Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus. *The EMBO journal.* 1998. 17(5): p.1289-1296.

Siegrist, C. A., Barrios, C., Martinez, X., Brandt, C., Berney, M., Cordova, M., Kovarik, J. and Lambert, P. H. Influence of maternal antibodies on vaccine responses: inhibition of antibody but not T cell responses allows successful early prime-boost strategies in mice. *Eur. J. Immunol.* 1998. 28: p. 4138-4148.

Sizemore D. R., Branstrom A. A., Sadoff, J. C. Attenuated *Shigella* as DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science.* 1995. 270: p. 299-302.

Stefan Niewiesk, Ingo Eisenhuth, Anthony Fooks, J.C.S. Clegg, Jens-Jörg Schnorr, Sibylle Schneider-Schaulies, and Volker ter Meulen. Measles virus-induced immune suppression in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) model depends on viral glycoproteins. *Journal of Virology.* 1997. 71: p. 7214-7219.

Ter Meulen, V., Löffler, S., Carter, M.J. und Stephenson, J.R. Antigenic characterization of measles and SSPE virus hemagglutinin by monoclonal antibodies. *J. Gen Virol.* 1981. 57: p. 357.

Udem, S. A., Cook, K. A.: Isolation and characterization of Measles virus intracellular nucleocapsid RNA. *J. Virol.* 1984. 49: p. 57-65.

Van Binnendijk, R. S., M. C. M. Poelen, P. de Vries, H. O. Voorma, A. D. M. E. Osterhaus, F. G. U. M. Uytdehaag. Measles virus-specific human T cell clones: characterization of specificity and function of CD4 helper/cytotoxic and CD8 cytotoxic T cell clones. *J. Immunol.* 1989. 142: p. 2847 - 2854.

Van Binnendijk, R. S., M. C. M. Poelen, K. C. Kuijpers, A. D. M. E. Osterhaus, F. G. U. M. Uytdehaag. The predominance of CD8 T cells after infection with measles virus suggests a role of CD8 class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL) in recovery from measles. *J. Immunol.* 1990. 144: p. 2394 - 2399.

van Binnendijk, R. S., van Baalen, C. A., et al. Measles virus transmembran fusion protein synthesis de novo or presented in immunostimulating complexes is endogenously processed for HLA class I and class II-restricted cytotoxic T cell recognition. *J. Exp. Med.* 1992. 176: p. 119-128.

van Binnendijk, R. S., van der Heijden, R. W., van Amerongen, G., Uytdehaag, F. G. and Osterhaus, A. D. Viral replication and development of specific immunity in macaques after infection with different measles virus strains. *J. Infect. Dis.* 1994. 170: p. 443-448.

van Binnendijk, R. S., van der Heijden, R. W. J. and Osterhaus, A. D. M. E., Monkeys in measles research. In Billeter, M. A. and ter Meulen, V. (Eds.) *Measles Virus*. Springer, Berlin 1995. p 135-148.

Varsanyi, T. M., Jörnvall, H., Norrby, E. Isolation and characterization of the Measles virus F1 polypeptide: comparison with other paramyxovirus fusion proteins. *Virology.* 1985. 147: p. 110-117.

Wang, Y., et al. Effect of passive immunization or maternally transferred immunity on the antibody response to a genetic vaccine to rabies virus. *J. Virol.* 1998. 72: p. 1790-1796.

Waynforth and Flecknell. *Experimental and surgical technique in the rat*. Academic press. 1992. San Diego, CA 92101.

Whittle, H. C., Mann, G., Eccles, M., O'Neill, K., Jupp, L. Hanlon, L., Marsh, V. Effects of dose and strain of vaccine on success of measles vaccination of infants aged 4-5 months. *Lancet.* 1988. 1: p. 963-969.

Wyde, P. R., Moore-Poveda, D. K., Daley, N. J. and Oshitani, H. Replication of clinical measles virus strains in hispid. cotton rats. *PSEBM* 1999. 221: p. 53-62.

Xiang, Z. Q. and Ertl, H. C. J. Transfer of maternal antibodies results in inhibition of specific immune responses in the offspring. *Virus Res.* 1992. 24: p. 297-314.

Yamanouchi, K., et al. Immunisation of cattle with a recombinant vaccinia vector expressing the hemagglutinin gene of rinderpest virus. *Vet. Rec.* 1993. 132: p. 152-156.

Yang, K., Mustafa, F., Valsamakis, A., Santora, J. C., Griffin, D. E. and Robinson, H. L. Early studies on DNA-based immunizations for measles virus. *Vaccine.* 1997. 15: p. 888-891.

Zhu, Y., Fennelly, G., Miller, C., Tarara, R., Saxe, I., Bloom, B. and McChesney, M., Recombinant Bacille Calmette-Guérin expressing the measles virus nucleoprotein protects infant Rhesus macaques from measles virus pneumonia. *J. Inf. Dis.* 1997. 176: p. 1445-1453.

Zinkernagel, R. M., Adler, B., Holland, J. J. Cell-mediated immunity to vesicular stomatitis virus infections in mice. *Exp. Cell Biol.* 1978. 46: p. 53-70.

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	Mikro-
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
APME	Akute postinfektiöse Masernenzephalitis
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C	C Protein des MV
CD 4	T-Zell Oberflächenmarker
CD 8	T-Zell Oberflächenmarker
CDV	Canine distemper virus
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
Con A	Concanavalin A
cpm	„counts per minute“
CR	cotton rat
CRF	cotton rat Fibroblasten
CT 1	VSV Deletionsmutante
CT 1-H	VSV-H Deletionsmutante
CT 9	VSV Deletionsmutante
CT 9-H	VSV-H Deletionsmutante
CTL	zytotoxische T-Zellen
DABCO	1,4-Diazabicyclo (2.2.2) octan
DC	Dendritic cells
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds-RNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
ED	MV-Stamm Edmonston
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
F Protein	Fusionsprotein des MV
FACS	Fluorescence activated cell scanner
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
FKS	Fötale Kälberserum
Gp	Glykoprotein
H Protein	Hämagglutininprotein des MV
h	Stunden
H-2	Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen, Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen
HN	Hämagglutinin/Neuraminidase
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ 1

Hu2	MV-Edmonston-Stamm, der nach Immunisierung eine Enzephalitis induzierte
i. tr.	intratracheal
i.c.	intrazerebral
i.d.	intradermal
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IFN γ	γ -Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-12	Interleukin-12
IL-2	Interleukin-2
INF- γ	Interferon- γ
ISCOM	immuno stimulating complex
IU	Internationale Einheiten
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
L	„Large“ Protein (Polymerase) des MV
LPS	Lipopolysaccharid
M	Matrixprotein des MV
m	Milli-
M	Molar
M.O.I.	„multiplicity of infection“
MEM	Minimal essential medium
MHC	„major histocompatibility complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex
MIBE	Measles inclusion body encephalitis
min.	Minuten
mM	Millimolar
mRNS	„messenger-RNA“
MV	Masernvirus
MV-ED	Masernvirus Laborstamm Edmonston
N Protein	Nukleokapsidprotein des MV
NT	Neutralisationstest
P Protein	Phosphoprotein des MV
p.i.	post infectionem
PBE	Plaque bildende Einheiten
PBL	Periphere Blut Lymphozyten
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PRNT	Plaque Reduktionsneutralisationstest
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RPMI 1640	Roswell-Park-Memorial-Institute, Medium 1640
RPV	Rinderpest Virus
RSV	Respiratorisches Synzytial Virus
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek.	Sekunden
SSPE	Subakute sklerotisierende Panenzephalitis
Std.	Stunde
TCGF	„T cell growth factor“, T-Zell-Wachstumsfaktor

Th	T-Helfer-Zelle
U	Uridin
UV	Ultraviolett
V	V Protein des MV
Vol	Volumen
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VSV-G	VSV-Glykoprotein G
VSV-H	Vesikuläres Stomatitis Virus, welches das MV-H exprimiert
VSV-I	VSV-Wildtyp, Serotyp Indiana
VSV-WT	VSV-Wildtyp
VV	Vakziniavirus
VVR	Vakziniavirusrekombinante
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Lebenslauf

Bernd Schlereth
geboren am 06.11.1971
in Bad Brückenau
ledig

Ausbildungshintergrund:
Mikrobiologe

Berufliche Ausbildung

- seit 05/ 1997 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** im Institut für Virologie und Immunbiologie der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, Institutsvorstand: Prof. V. ter Meulen
Anfertigung einer Dissertation mit dem Thema:
Entwicklung alternativer Vakzinierungsstrategien gegen Masernvirusinfektionen im Tiermodell
- 05.1996 - 03.1997 **Diplomant** im Institut für Mikrobiologie der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, Institutsvorstand: Prof. W. Goebel

Anfertigung einer Diplomarbeit mit dem Thema:
Herstellung eines Lebendimpfstoffes gegen Masernviren auf der Basis attenuierter Salmonellen und Listerien
11. 1993 - 04.1996 Hauptstudium der Biologie, Studiengang Diplom
Hauptfach: Mikrobiologie
1. Nebenfach: Biochemie
2. Nebenfach: Zell- und Entwicklungsbiologie
Abschluß: Diplom-Biologe (Univ.) Gesamtnote: sehr gut
- 11.1991 - 10.1993 Grundstudium der Biologie, Studiengang Diplom

Schulausbildung

- 1982 - 1991 Johann-Philipp-von-Schönborn-Gymnasium Münnerstadt
1978 - 1982 Grundschule Lauter