

Theda Elisabeth Schuh
Dr. med.

Plasmid-DNA Vakzine schützt Mäuse gegen La Crosse Virus Infektion durch humorale Immunantwort

Geboren am 26.01.1976 in Kiel

Reifeprüfung am 15.05.1995 in Hannover

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1995/96 bis SS 2001

Physikum am 10.09.1997 an der Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr an der Columbia University, New York (USA), Duke University, Durham (USA) und Universität Heidelberg

Staatsexamen am 27.11.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene

Referent: Herr Prof. Dr. med. G. Darai

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Impfmethode im Tiermodell getestet, die aus genetischem Material besteht. Diese sog. DNA-Vakzine ermöglicht die Expression von Antigenen im Organismus, indem die für sie kodierenden Gene als „nackte DNA“ intramuskulär injiziert wird. Als Antigene wurden die Hüllproteine bzw. das Nukleoprotein des La Crosse Virus, LACV, gewählt. LACV zählt zu den Bunyaviridae, das besonders im Mittelwesten der USA von Mücken auf den Menschen übertragen werden und eine Enzephalitis auslösen kann. Die beiden Gene, die für die Hüllproteine bzw. das Nukleoprotein kodieren, wurden jeweils in eine Plasmid-DNA kloniert, die als Expressionsvektoren die Übersetzung der DNA in ein Protein im Organismus ermöglichen. Die erfolgreiche Expression der viralen Antigene wurde in Zellkultur durch Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Analyse getestet, bevor die DNA für die Immunisierung verwendet wurde.

Als Tiermodell eignen sich Mäuse, die wegen eines gentechnisch hergestellten Defekts im Immunsystem an einer LACV-Infektion erkranken und sterben. Der Defekt beruht auf einem nicht funktionsfähigen Rezeptor für Interferon- α / β , antiviralen Zytokinen, die normalerweise vor einer LACV-Infektion schützen. Diese IFNAR-1^{-/-} Mäuse wurden nach der DNA-Immunisierung mit einer tödlichen Dosis LACV intraperitoneal infiziert und anhand ihrer Überlebensrate konnte der Immunisierungserfolg evaluiert werden.

Die Immunisierung mit DNA, die für die LACV-Hüllproteine kodierte, schützte alle Mäuse vor einer Infektion. Dieses Ergebnis konnte in zwei weiteren Immunisierungsversuchen bestätigt werden. Der Schutz nach Immunisierung gegen die Hüllproteine ist auf die Bildung neutralisierender Antikörper zurückzuführen. Sie wurden im Serum der Mäuse durch den empfindlichen serologischen Neutralisationstest nachgewiesen. Dieser Test ermöglichte auch eine relative Abschätzung der Antikörperkonzentration durch den Vergleich mehrerer Seren untereinander.

Die Immunisierung mit DNA gegen das LACV-Nukleoprotein führte in zwei von drei Versuchen zu einem deutlich geringeren Schutz vor einer Infektion (70-80% Letalität). Er ist darauf zurückzuführen, daß die Immunisierung gegen das Nukleoprotein nicht die Bildung neutralisierender Antikörper hervorrief, sondern eher die Bildung zytotoxischen T-Zellen. Im abweichenden Versuch blieben alle Mäuse vollständig geschützt, was auf eine verminderte Aktivität der Viruspartikel hindeuten könnte, die für die Infektion verwendet wurden. Daraus

ergab sich die Frage, ob der Schutz durch zytotoxische T-Zellen von dem Titer des Erregers abhängen kann.

Die zelluläre Antwort verhinderte die Virusausbreitung in der virämischen Phase nicht so nachhaltig wie humorale Antikörper, die die Viruspartikel neutralisierten und somit ein Andocken an die Zielzelle verhinderten. Die Titration der Viruskonzentration in Gehirnen 10 Tage nach LACV-Infektion zeigte, daß Mäuse nach DNA-Immunisierung gegen die Hüllproteine vor einer Ausbreitung ins Gehirn geschützt blieben. Auch immunhistochemische Untersuchungen der Gehirne konnten keine Viruspartikel nachweisen. Die virämische Phase, die effizient mit der Vakzine gegen die Hüllproteine und der daraus resultierenden neutralisierenden Antikörper verhindert werden konnte, spielt im Lebenszyklus von LACV eine wichtige Rolle

Die Depletion, bestimmter Zellen des Immunsystems sollte Aufschluß über ihre Rolle bei der Immunantwort nach DNA-Injektion geben. Dazu wurden T-Helferzellen ($CD4^+$ -Zellen) und zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$ -Zellen) durch Injektion spezifischer Antikörper depletiert. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß $CD4^+$ -Zellen nach Immunisierung gegen die Hüllproteine eine Rolle spielen, denn ihre Depletion verringerte den Schutz vor einer Infektion.

In dieser Arbeit wurde auch die Kombination von DNA, die für die Zytokine IL-12 und GM-CSF kodiert, mit der DNA-Vakzine durchgeführt, um einen stimulatorischen Effekt auf die Immunantwort nachzuweisen. Die Überlebensrate besonders der Mäuse, die gegen das Nukleoprotein immunisiert worden waren, konnte nicht verbessert werden. Es ist nur ein verbesserter Schutz der Kontrollmäuse aufgefallen, was auf eine unspezifische Stimulation durch das exprimierte Zytokin oder durch immunstimulatorische Sequenzen in der Plasmid-DNA selbst zurückzuführen war.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß die DNA-Vakzine in einem geeigneten Tiermodell erfolgreich getestet werden konnte. Sie verlieh einen effizienten Schutz vor einer Infektion, der auf der Bildung neutralisierender Antikörper beruhte und durch $CD4^+$ -Zellen vermittelt wurde.