Rekombinante Proteine als Impfstoffkandidaten gegen Hantavirusinfektionen

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Virologie

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. rer. nat. Rainer Ulrich

geboren am 29. Mai 1958
in Berlin

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Mlynek
Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Frau Prof. Angelika Vallbracht (Bremen)
2. Herr Prof. Gholamreza Darai (Heidelberg)

Eingereicht am: September 2002

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 25. März 2003

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Vorwort	3
2.	Einleitung	3
3.	Nachweis und Typisierung von humanpathogenen Hantaviren in Mitteleuropa	6
4.	Entwicklungsstrategien für Hantavirusimpfstoffe	8
5.	Virus-ähnliche Partikel auf der Basis des Hepatitis B Virus-Coreproteins: Identifizierung potentieller Insertionsorte für Fremdepitope	11
6.	Induktion einer protektiven Immunität gegen Hantaviren im Rötelmausmodell durch Immunisierung mit chimären Corepartikeln	15
7.	Die Protektivität von Nukleokapsid-Proteinabschnitten ist von Insertionsort im Coreprotein und dem Puumalavirus-Stamm abhängig	17
8.	Hefe-exprimiertes Puumalavirus-Nukleokapsidprotein als potentielle Hantavirusvakzine	18
9.	Kartierung von Epitopen und Identifikation von protektiven Regionen im Nukleokapsidprotein	19
10.	Zusammenfassung und Ausblick	23
11.	Literaturverzeichnis	29
11.1.	Eigene Veröffentlichungen	29
11.2.	Veröffentlichungen anderer Autoren	31
12.	Danksagung	38
13.	Eidesstattliche Versicherung gemäss Habilitationsordnung der Charité	40

1. VORWORT

Die vorliegende Habilitationsschrift beschreibt den gegenwärtigen Kenntnisstand zur Verbreitung von Hantavirusinfektionen in Mitteleuropa und der Impfstoffentwicklung gegen Hantaviren. Die eigenen Beiträge zu dieser Thematik sind in 11 Originalartikeln [1-11] dokumentiert. Aus Gründen der Verständlichkeit werden wichtige Erkenntnisse, die in den eigenen Übersichtsartikeln [12-14] weiter ausgeführt werden, kurz zusammengefasst. Kopien dieser 14 Publikationen sind in der gleichen Reihenfolge als Anlage angefügt. Für die Strategie der eigenen Arbeiten bedeutende Veröffentlichungen sind im Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge zitiert; für eine komplette Literaturübersicht sei auf die Literaturverzeichnisse der angefügten Veröffentlichungen verwiesen.

Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen, die Gegenstand eines im Rahmen der EU geförderten internationalen Netzwerkes mit Forschergruppen in Riga, Vilnius und Stockholm sind, war die Entwicklung einer potentiellen europäischen Hantavirusvakzine. Diese Zielstellung geht von der Überlegung aus, dass Erkenntnisse, die für eine europäische Hantavirusvakzine gewonnen werden, auch auf die asiatischen und amerikanischen Hantaviren übertragbar sein sollten. Außerdem gibt es Anhaltspunkte für eine Kreuzprotektivität zwischen europäischen und amerikanischen Hantaviren.

2. EINLEITUNG

Hantaviren stellen einen separaten Genus *Hantavirus* innerhalb der Familie Bunyaviridae dar. Insbesondere seit der Entdeckung des Hantaviralen Pulmonalen Syndroms (HPS) in den USA im Jahre 1993 haben Hantaviren erhöhte Aufmerksamkeit in der Öffentlichkeit und Forschung gefunden. Weltweit werden jährlich ca. 200.000 bis 300.000 Fälle des durch Hantaviren verursachten Hämorrhagischen Fiebers mit Renalem Syndrom (HFRS) diagnostiziert. Sehr wahrscheinlich werden viele weitere HFRS-Fälle nicht erkannt, weil einerseits bei akutem Nierenversagen nicht an eine Hantavirusinfektion gedacht wird und andererseits die technischen Voraussetzungen für eine entsprechende Virusdiagnostik fehlen. Die in Europa und Asien verbreiteten humanpathogenen Hantaviren sind mit dem HFRS assoziiert (siehe Abschnitt 3), während die humanpathogenen Hantaviren in Nord- und Südamerika das HPS

hervorrufen, das wegen seiner hohen Letalität (bis zu 60 %) besonders große gesundheitspolitische Relevanz besitzt. Die schwersten klinischen Verläufe beim HFRS werden durch Infektionen mit dem asiatischen Hantaanvirus (HTNV) und dem europäischen Dobravavirus (DOBV), wahrscheinlich der süd-/südosteuropäischen genetischen Linie DOBV-Af (siehe Abschnitte 3 und 10), hervorgerufen (Letalität 5-12 %). Sowohl HFRS als auch HPS sind zunächst durch hohes Fieber und Grippe-ähnliche Symptome gekennzeichnet, bevor die typischen Symptome einer Nierenfunktionsstörung oder kardiopulmonalen Dysfunktion auftreten. Hämorrhagien werden nur bei schweren Verläufen des HFRS beobachtet. Neben dieser charakteristischen Symptomatik wurden andererseits auch bei HPS-Patienten Störungen der Nierenfunktion und/oder Hämorrhagien und bei HFRS-Fällen Lungenfunktionsstörungen beobachtet. Milde klinische Verläufe des HFRS in Europa, die auch als Nephropathia epidemica bezeichnet werden, werden durch das Puumalavirus (PUUV) hervorgerufen. Ähnliche milde Verläufe wurden für DOBV-Infektionen in Mittel- und Osteuropa beschrieben, die möglicherweise mit Infektionen durch die ost-/mitteleuropäische genetische Linie DOBV-Aa assoziiert sind ([12], [13], siehe Abschnitte 3 und 10).

Im Gegensatz zu den anderen Genera der Bunyaviridae werden Hantaviren nicht durch Arthropoden, sondern durch asymptomatisch persistent infizierte Nagetiere auf den Menschen übertragen. Deshalb stellen bestimmte Personengruppen wegen ihres Berufes oder Wohnortes Risikogruppen für Hantavirusinfektionen dar. Dazu zählen Bauern, Waldarbeiter, Säugetierkundler, Bisamrattenfänger und Soldaten im Felde, bei denen in seroepidemiologischen Untersuchungen eine im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung höhere Seroprävalenz beobachtet wurde (siehe [12], [13]). So geht die Entdeckung der Hantaviren auf intensive Untersuchungen zurück, die infolge des Auftretens des Koreanischen Hämorrhagischen Fiebers bei ca. 3000 Soldaten der UN-Truppen während des Koreakrieges Anfang der fünfziger Jahre initiiert wurden und zur Entdeckung des Prototypvirus HTNV führten (Lee et al., 1978). Bisher gibt es lediglich einen Bericht aus Südamerika, der eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung von Hantaviren nahelegt (Padula et al., 1998).

Interessanterweise werden Hantaviren, die in Nord- und Südamerika das HPS hervorrufen, von nur in Nord- und Südamerika vorkommenden Vertretern der Neuweltnagetiere (Unterfamilie Sigmodontinae) auf den Menschen übertragen, wohingegen HFRS-Erkrankungen unterschiedlicher Schweregrade in Europa und Asien durch Viren verursacht werden, die von Echten Mäusen (Murinae) und Wühlmäusen (Arvicolinae) getragen werden. Mit zuneh-

mender Kenntnis verschiedener Hantavirus-Species und ihrer entsprechenden Nagetier-Reservoirwirte wurde deutlich, dass es eine strenge Assoziation von Hantavirus-Species und entsprechendem Nagetierwirt gibt. So ist beispielsweise das PUUV an die Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*) adaptiert, während das HTNV von der Brandmaus (*Apodemus agrarius*) getragen wird. Phylogenetische Stammbaum-Analysen von Nukleinsäuresequenzen von Hantaviren einerseits und der von Nagetier-Wirten andererseits legten eine Koevolution von Hantaviren und Nagetier-Wirten nahe. Wenngleich die Theorie der Koevolution von Hantaviren und Nagetier-Reservoirwirten inzwischen etabliert ist, gibt es zunehmend auch Hinweise auf andere Evolutionsfaktoren wie Wirtswechsel (host switch) sowie Reassortment und intragenische Rekombinationsprozesse. Inwieweit der Nachweis von Hantavirus-spezifischen Antikörpern oder Nukleinsäuresequenzen in Vertretern anderer Säugetier-Ordnungen, wie Katze, Hund, Elch und Fledermaus, Bedeutung für die weitere Verbreitung des Virus hat und einen echten Wirtswechsel anzeigt oder nur eine limitierte Infektion ohne Weiterverbreitung des Virus in der neuen Wirtsspecies (sog. spill over-Infektion) darstellt, ist im Augenblick eine wissenschaftlich hochinteressante, offene Frage [13].

Hantaviren sind umhüllte sphärische Viren mit einem Durchmesser von 80-110 nm. Ihr einzelsträngiges dreigeteiltes RNA-Genom negativer Polarität kodiert 4 Proteine: Das S-Genomsegment kodiert das Nukleokapsidprotein (N-Protein). Die Hüllproteine G1 und G2 werden als Vorläufer-Glykoprotein vom Transkriptionsprodukt des M-Segments translatiert. Im Virion ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase enthalten, die vom L-Segment kodiert wird (siehe [12]). Bei anderen Genera der Bunyaviren (*Bunyavirus*, *Phlebovirus* und *Tospovirus*) wurden auf den Genomsegmenten S und M neben den kodierenden Sequenzen für N-Protein und Vorläufer-Glykoprotein offene Leserahmen (ORF) gefunden, die Nichtstrukturproteine kodieren (S-Segment: NSs; M-Segment: NSm), über deren Funktion bisher wenig bekannt ist. Obwohl das auf dem S-Segment des Bunyamweravirus (Genus *Bunyavirus*) kodierte NSs ein nichtessentielles Genprodukt für die Replikation des Virus in Zellkultur und Mausmodell darstellt, besitzt es verschiedene Funktionen im Replikationszyklus des Virus (Bridgen et al., 2001). Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass dieses Protein als Antagonist der Interferon α/β-Induktion die Virulenz des Virus erhöht (Weber et al., 2002). Im Gegensatz dazu sind bei Hantaviren bisher keine Nichtstrukturproteine gefunden worden, obgleich beispielsweise auf dem S-Segment von bestimmten Hantaviren, die mit Arvicolinae-Nagetierwirten assoziiert sind (z. B. PUUV; Tulavirus, TULV), neben dem N-Protein kodierenden ORF ein zweiter, überlappender ORF existiert, der ein potentielles Protein von 90

Aminosäuren (AS) kodieren könnte. Während dieser ORF2 für die Vermehrung von PUUV und TULV in Zellkultur scheinbar nicht notwendig ist und z.T. durch ein Stopkodon unterbrochen wird, ist dieser Leserahmen bei aus Nagetieren isolierten S-Segment-Sequenzen der genannten Virus-Species konserviert (Diester, Hertel, Herzel und Ulrich, unveröffentlichte Daten).

3. NACHWEIS UND TYPISIERUNG VON HUMANPATHOGENEN HANTAVIREN IN MITTELEUROPA

Humane Hantavirusinfektionen sind durch eine nur kurze Phase der Virämie gekennzeichnet. Da auch die klinischen Parameter des HFRS in Europa oft unspezifischer Natur sind, wird die Diagnose einer Hantavirusinfektion in der Regel über den Nachweis Hantavirus-spezifischer Antikörper gestellt. Die klassische Hantavirus-Serodiagnostik beruht auf dem Immunfluoreszenztest unter Verwendung Hantavirus-infizierter Säugerzellen. Daneben wurden in den vergangenen Jahren hochsensitive und -spezifische IgM- und IgG-ELISA-Tests entwickelt. Diese Tests basieren auf dem Nachweis von N-Protein-spezifischen Antikörpern, da diese Antikörper bereits sehr früh nach Hantavirusinfektion gebildet werden. Da N-Protein-spezifische IgG-Antikörper noch lange Zeit nach Infektion nachweisbar sind, können entsprechende ELISA-Tests für seroepidemiologische Studien eingesetzt werden. Als Antigene werden Lysate von Hantavirus-infizierten Zellkulturen oder rekombinant exprimierte Hantavirusproteine verwendet. Als Expressionssysteme werden *E. coli* (Zöller et al., 1993), Insektenzell-Systeme (Vapalahti et al., 1996; Brus Sjölander et al., 2000), transgene Pflanzen (Kehm et al., 2001) und Hefen (Meisel, Ulrich et al., in Vorbereitung) genutzt. Da sich einerseits rekombinante N-Protein-Derivate in ihrer Antigenität nicht oder nur geringfügig vom virionständigen Protein unterscheiden, Hantaviren jedoch in Hochsicherheitslaboren (Sicherheitsstufe 3) kultiviert werden müssen, werden gegenwärtig bevorzugt rekombinante Proteine in der serologischen Diagnostik eingesetzt. Daneben werden eine Reihe weiterer Tests (z. B. Immunoblot) zur Bestätigung der ELISA-Ergebnisse verwendet [12]. Zur Diagnostik kann auch der Nachweis von Virusnukleinsäure aus dem Blut, Urin oder Bioptatmaterial von inneren Organen dienen (Papa et al., 1998).

Nachdem von uns ELISA-Tests zum Nachweis von N-Protein-spezifischen Antikörpern von HTNV, PUUV und TULV auf der Basis *E. coli*-exprimierter N-Protein-Derivate dieser Viren entwickelt worden waren, wurden die rekombinanten Proteine zum Nachweis von

Hantavirus-spezifischen Antikörpern in Human- und Nagetierseren verwendet. Als Bestätigungstests wurden von uns Immunfluoreszenztests auf der Basis Hantavirus-infizierter Vero E6-Affennnierenzellen etabliert [1, 2].

Wegen der starken Kreuzreaktivität der N-Proteine insbesondere nah verwandter Hantaviren, wie z. B. HTNV, DOBV und Seoulvirus (SEOV), wird zur Typisierung von Hantavirusinfektionen ein Neutralisationstest (Focusreduktionsneutralisationstest, FRNT) verwendet. Durch Einsatz des Chemilumineszenzprinzips konnte der Neutralisationstest von uns weiterentwickelt werden [3]. Von großem Vorteil ist dabei insbesondere die Möglichkeit der Fotodokumentation der Testergebnisse. Außerdem konnte die Testdauer, die für die unterschiedlichen Viren bisher 7 (HTNV) bis 13 Tage (PUUV) betrug (Lundkvist et al., 1997a; [2]), auf 5 bis 11 Tage verkürzt werden. Dieser Chemilumineszenz-FRNT (cFRNT) konnte auch erfolgreich für die *in vitro*-Testung der antiviralen Aktivität von Ribavirin gegen HTNV eingesetzt werden und bestätigte die von anderen Autoren berichtete wirksame Dosis von Ribavirin [3].

Unter Verwendung der obengenannten Tests konnten wir zeigen, dass in Mitteleuropa (Deutschland und Slowakei) Infektionen mit den humanpathogenen Species DOBV und PUUV vorliegen [1, 2]. In Deutschland wurde eine Seroprävalenz für Hantaviren in der Bevölkerung von 1-2 % ermittelt, obgleich die Seroprävalenz in Endemiegebieten (z. B. Schwäbische Alb) und bei Risikogruppen höher ist (Zöller et al., 1995; Meisel, Koch et al., unveröffentlichte Daten). Unter Verwendung diagnostischer Patienten-Serumproben, Serumproben von Risikogruppen und anderer Serumpanels aus Deutschland, der Slowakei und Litauen konnten mit Hilfe des FRNT/cFRNT bisher insgesamt 30 PUUV- und 40 DOBV-Infektionen identifiziert werden ([1]; [2]; Leitmeyer et al., 2001; Ulrich, Ziaja, Meisel und Krüger, unveröffentlichte Daten). In Übereinstimmung mit Daten der Gruppe von Åke Lundkvist (Lundkvist et al., 1997a) konnte bei 3 frühen Serumabnahmen keine Typisierung durchgeführt werden (gleiche reziproke FRNT-Endpunkttiter für verschiedene Virus-Species), während späte Seren aus der Rekonvaleszenz-Phase der Patienten eindeutig stattgefundene DOBV- bzw. PUUV-Infektionen anzeigten (Ulrich, Ziaja, Rasche, Meisel und Krüger, unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz zu früheren Postulaten anderer Autoren konnten wir bisher in Deutschland keine Infektionen mit den Viren HTNV und SEOV identifizieren. Augenscheinlich sind ältere derartige Berichte in der Literatur auf das damalige Fehlen eines Neutralisationstests für das für Europa repräsentative DOBV zurückzuführen. Desweiteren

zeigten molekulargenetische Untersuchungen, dass in Europa zwei genetische Linien des DOBV (DOBV-Aa, DOBV-Af) sympatrisch vorliegen, die in unterschiedlichen Nagetierspecies, der Brandmaus, *Apodemus agrarius*, und der Gelbhalsmaus, *A. flavicollis*, vorkommen und möglicherweise mit unterschiedlich schweren Verläufen des HFRS assoziiert sind ([2]; [13]; Klempa et al., unveröffentlichte Daten; siehe Abschnitt 10).

4. ENTWICKLUNGSSTRATEGIEN FÜR HANTAVIRUSIMPFSTOFFE

Wenngleich das Risiko der Hantavirus-Übertragung von Nagetieren auf den Menschen durch bestimmte Verhaltensmaßregeln reduziert werden kann (siehe „Wie vermeide ich Hantavirus-Infektionen"; Homepage des Instituts für Virologie: www.charite.de/virologie/hantapraev.pdf), ergibt sich die Notwendigkeit der Entwicklung von Hantavirusimpfstoffen, aus folgenden Gesichtspunkten:

(i) In bestimmten Regionen der Welt (insbesondere Asien) kommen Hantavirusinfektionen endemisch vor.

(ii) Wegen der hohen Letalitätsrate bei Infektionen mit amerikanischen Hantaviren besteht ein großes gesundheitspolitisches Interesse an der Entwicklung wirksamer Impfstoffe.

(iii) Risikogruppen (siehe Abschnitt 2) könnten durch eine Vakzinierung wirksam vor Infektionen geschützt werden.

Für die Entwicklung effektiver Impfstoffe ist die Kenntnis der zugrunde liegenden Protektionsmechanismen und der daran beteiligten viralen Komponenten von großer Wichtigkeit. Wie für umhüllte Viren zu erwarten, kann durch Immunisierung mit Hantavirus-Glykoprotein-Derivaten eine schützende Immunität induziert werden, die sehr wahrscheinlich durch die Wirkung Virus-neutralisierender Antikörper vermittelt wird (Schmaljohn et al., 1990; Xu et al., 1992; Hooper et al., 1999). In Übereinstimmung damit konnten Virus-neutralisierende Eigenschaften für Glykoprotein-spezifische monoklonale Antikörper (mAks) *in vitro* (Lundkvist et al., 1992, 1993) und *in vivo*, durch passiven Transfer der Antikörper und nachfolgenden Virus-Challenge in Maus- und Hamster-Modellen (Schmaljohn et al., 1990; Arikawa et al., 1992), nachgewiesen werden. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass Immunisierungen mit rekombinanten N-Protein-Derivaten eine schützende Immunreaktion induzieren können (siehe unten). Obgleich vermutet wird,

dass die virushemmende Wirkung der N-Protein-Immunisierung durch zelluläre Immunantworten vermittelt wird, können bisher auch andere Mechanismen nicht ausgeschlossen werden (siehe Abschnitte 9 und 10).

Trotz der Kenntnis möglicher Protektionsmechanismen und der beteiligten viralen Komponenten erfolgte die bisherige Entwicklung potentieller Hantavirusimpfstoffe vor allem auf der Basis eines „trial and error"-Schemas. Während bisher keine Untersuchungen zur Etablierung von attenuierten Vollvirus-Impfstoffen vorliegen, wird bereits seit vielen Jahren, wegen des endemischen Vorkommens von Hantavirusinfektionen insbesondere in asiatischen Ländern, an der Herstellung von inaktivierten Virusimpfstoffen gearbeitet. So liegen bereits umfangreiche Daten zur Wirksamkeit einer inaktivierten HTNV-Vollvirusvakzine (Hantavax) vor. Der Einsatz dieser Vakzine und ähnlicher inaktivierter, auch bivalenter (HTNV/SEOV), Hantavirusimpfstoffe in Endemiegebieten lieferte eindrucksvolle Hinweise für deren Wirksamkeit (Lee et al., 1999), obgleich eine Optimierung dieser Impfstoffe vonnöten zu sein scheint (Cho and Howard, 1999). Als Problem dieser Tot-Impfstoffe sind die geringen und schnell abfallenden Titer Virus-neutralisierender Antikörper erkannt worden, weshalb häufige Auffrischungsimpfungen erforderlich sind. Ein weiterer Nachteil ist das mit der Herstellung und Anwendung verbundene Sicherheitsrisiko: Hantaviren sind wegen ihres Gefährdungspotentials in die Risikogruppe „3" eingeordnet worden und erfordern somit spezielle Sicherheitslaboratorien für ihre Handhabung. Wie allgemein für inaktivierte Virusimpfstoffe besteht auch hier das Risiko einer verbleibenden Infektiosität wegen unvollständiger Inaktivierung.

Als Alternative zu den inaktivierten Vollvirus-Vakzinen sind verschiedene rekombinante Hantavirus-Impfstoffe hergestellt worden (Übersicht in [12]). Dazu zählen rekombinante Lebendimpfstoffe auf der Basis verschiedener Pockenviren (z. B. Vaccinia Virus, VACV), Tot-Impfstoffe (rekombinante Proteine, Virus-ähnliche Partikel) und Nukleinsäurevakzinen (nackte DNA). In verschiedenen Tiermodellen konnte sowohl mit Glykoprotein- als auch N-Protein-Derivaten eine schützende Immunität induziert werden. Klinische Studien mit einer VACV-Rekombinante, die S- und M-Segment von HTNV enthält, zeigten in 3/4 der VACV-naiven Probanden, aber nur bei etwa einem Viertel der VACV-immunen Probanden die Bildung Hantavirus-neutralisierender Antikörper (McClain et al., 2000).

Unsere eigenen Untersuchungen basierten auf den Ergebnissen verschiedener Gruppen, dass N-Protein-kodierende VACV-Rekombinanten und rekombinantes N-Protein von Hantaviren, exprimiert in *Escherichia coli* oder mit Hilfe des Baculovirussystems in Insektenzellen,

in Tiermodellen eine protektive Immunantwort induzieren können (Schmaljohn et al., 1990, 1999; Xu et al., 1992; Lundkvist et al., 1996).

Aus den von uns durchgeführten seroepidemiologischen Untersuchungen (siehe Abschnitt 3) ergab sich, dass eine europäische Hantavirusvakzine die Hantavirus-Species PUUV und DOBV enthalten muss. Da die Gruppe um Åke Lundkvist in Stockholm ein Challenge-Tiermodell für PUUV auf der Basis einer nicht-infizierten Rötelmaus-Kolonie etabliert hatte (Lundkvist et al., 1996; siehe Abschnitt 6), konzentrierten sich unsere Untersuchungen zunächst auf die Herstellung einer PUUV-spezifischen Vakzine. Als Ausgangsmaterial wurden N-Protein-kodierende Sequenzen von zwei PUUV-Stämmen, eines schwedischen (Stamm Vranica/Hällnäs; Reip et al., 1995) und eines russischen PUUV (Stamm CG18-20; Stohwasser et al., 1990), verwendet.

Von uns wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Herstellung von potentiellen Hantavirusvakzinen verfolgt:

i. Präsentation von ausgewählten Regionen des PUUV-N-Proteins auf Virus-ähnlichen Partikeln

ii. Herstellung von komplettem rekombinantem PUUV-N-Protein

(i) Virus-ähnliche Partikel (virus-like particles; VLPs) können durch heterologe Expression von viralen Strukturproteinen und deren spontane Zusammenlagerung (Assembly) gewonnen werden. VLPs sind den entsprechenden Viren in struktureller und immunologischer Hinsicht sehr ähnlich, jedoch wegen des Fehlens viraler Nukleinsäure nicht infektiös. Zur Herstellung von VLPs können verschiedene Expressionssysteme verwendet werden, wie Bakterien, Hefen, Säugerzellen und transgene Pflanzen. VLPs besitzen eine Reihe von Vorteilen gegenüber monomeren rekombinanten Proteinen: Aufgrund der repetitiven partikulären Antigenstruktur sind VLPs hochimmunogen. So ist für verschiedene VLPs berichtet worden, dass sie auch ohne zusätzliche Verwendung von Adjuvantien eine starke Immunantwort hervorrufen. Außerdem ist für VLPs beschrieben worden, dass sie sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten induzieren können. Aus den genannten Gründen sind VLPs als antivirale Impfstoffe besonders interessant. So basiert der erste für humane Anwendungen zugelassene Impfstoff, der Impfstoff gegen Hepatitis B Virus (HBV), auf VLPs, die durch Hefeexpression des Oberflächenproteins des HBV (HBsAg) gebildet werden. Auch gegen humane Norwalk-, Papillom- und Rotaviren sind Impfstoffe auf der

Basis von VLPs in der klinischen Testung (siehe [12], 14]). Ein Nachteil von chimären VLPs ist deren begrenzte Insertionskapazität für Fremdepitope. Daraus ergibt sich, dass nur ausgewählte protektive Epitope/Proteinsegmente in chimäre VLPs eingebaut werden können. Andererseits kann diese Selektion die Induktion von sogenannten „enhancing“ Antikörpern verhindern, die die Virusinfektion nicht nur nicht blockieren oder eindämmen sondern sogar begünstigen, wie z. B. für Hüllprotein-spezifische Antikörper von Hantavirus und humanem Immundefizienzvirus (HIV) gezeigt werden konnte (Yao et al., 1992; Davis et al., 2001). Außerdem kann die Selektion von Proteinabschnitten wertvolle Hinweise auf protektive Regionen liefern.

(ii) Unter dem Gesichtspunkt einer möglichst breit gefächerten Immunantwort gegen verschiedene protektive Epitope im N-Protein erscheint die Verwendung des kompletten N-Proteins als vielversprechend. So gab es bereits vor Beginn der Arbeiten Hinweise, dass es mindestens 2 protektive Regionen im N-Protein des PUUV, zwischen den AS 1-118 und AS 229-327, gibt (Lundkvist et al., 1996). Außerdem könnte durch Immunisierung mit einem kompletten N-Protein ein Schutz gegen verschiedene Stämme einer Hantavirus-Species (z. B. PUUV) und möglicherweise sogar eine Kreuzprotektion gegen andere Hantavirus-Species induziert werden, wie vor kurzem berichtet wurde (de Carvalho Nicacio et al., 2002).

5. VIRUS-ÄHNLICHE PARTIKEL AUF DER BASIS DES HEPATITIS B VIRUS-COREPROTEINS: IDENTIFIZIERUNG POTENTIELLER INSERTIONSORTE FÜR FREMDEPITOPE

Bisher ist es noch keiner Arbeitsgruppe gelungen, autologe VLPs von Hantaviren, d. h. nur aus Hantavirus-Strukturproteinen aufgebaute VLPs, in großen Mengen herzustellen. Um jedoch die intrinsischen Vorteile von VLPs für die Hantavirusvakzine-Entwicklung auszunutzen, wollten wir chimäre VLPs auf der Basis von anderen Viren herstellen, die die Exposition von Hantavirus-Epitopen gestatten. Der aus der griechischen Mythologie entlehnte Begriff „Chimäre“ wird unter anderem zur Beschreibung von gentechnisch erzeugten Fusionsproteinen verwendet (Ulrich et al., 1996). Unter „chimären VLPs“ verstehen wir Aggregate von identischen Fusionsprotein-Untereinheiten (Abb. 1A); im Gegensatz dazu sind „Mosaik-VLPs“ aus zwei Proteinspecies aufgebaut: einem Trägerprotein und einer Träger-Fremdpro-

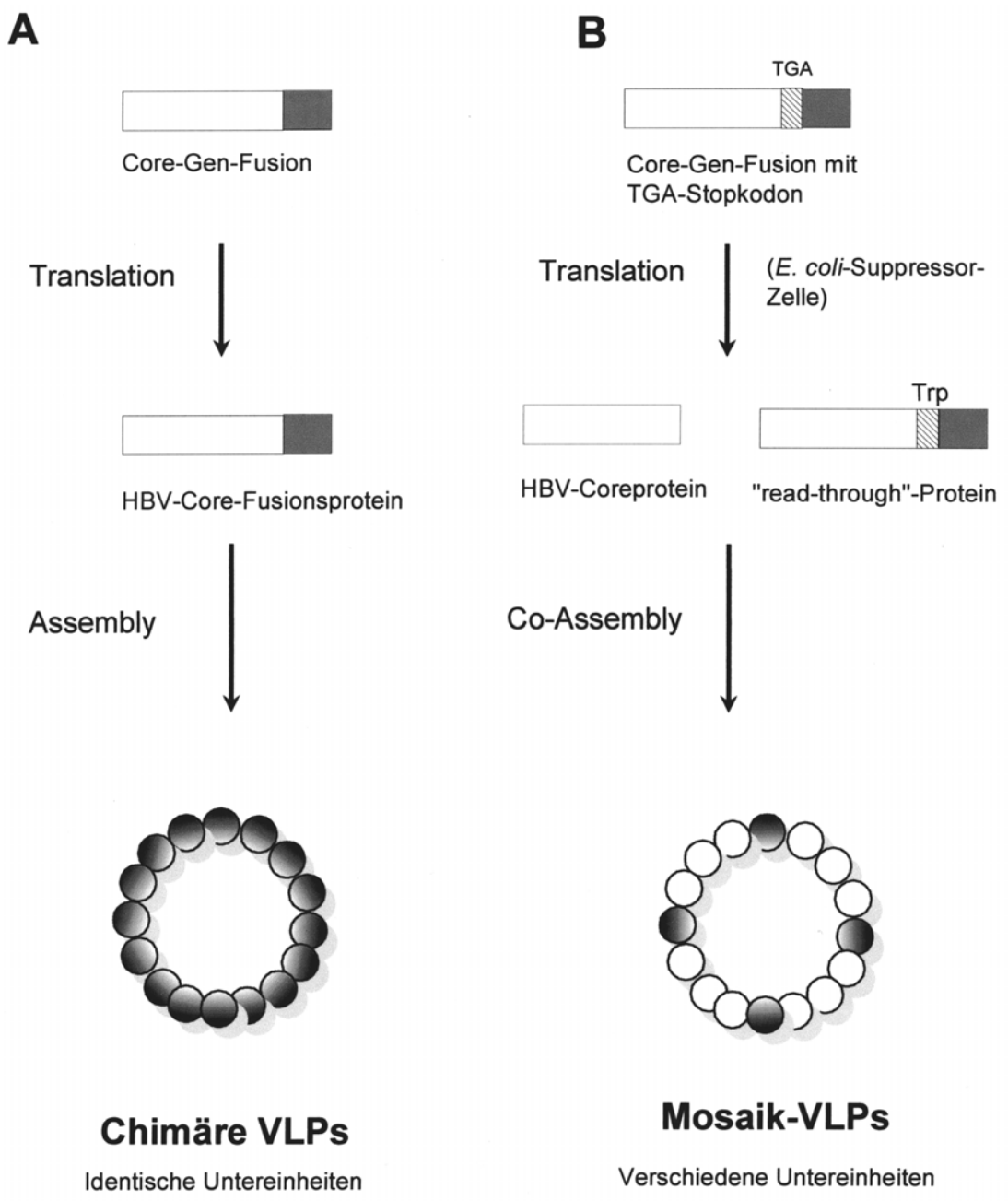

Abb. 1:

Herstellung von chimären (A) und Mosaik-VLPs (B), illustriert am Beispiel von HBV-Core-abgeleiteten Partikeln

Zur Herstellung von chimären VLPs (A) wird ein Fusionskonstrukt aus VLP-Träger (HBV-Core; offener Balken) - und Fremdprotein-kodierender Sequenz (grauer Balken) heterolog exprimiert, so dass die assemblierten VLPs aus identischen Untereinheiten bestehen. Mosaik-VLPs (B) werden erhalten durch Co-Assembly von VLP-Träger-Untereinheiten (HBV-Core) und VLP-Träger/Fremdprotein-Fusions-Untereinheiten. Diese Fusionen können z. B., wie hier gezeigt, durch einen Suppressor-tRNA-vermittelten read-through eines Stop-Kodons (UGA)

erhalten werden. Durch die Suppressor-tRNA wird bei einem UGA-Stopkodon die AS Tryptophan in das read-through-Protein eingebaut. Außerdem erfolgt jedoch am Stopkodon auch eine Termination der Translation, so dass gleichzeitig in einer *E. coli*-Zelle HBV-Core und HBV-Core-abgeleitetes read-through-Protein vorliegen, die zu Mosaik-VLPs assembliert werden [4].

tein-Fusion (Abb. 1B). Während bei Einbau von PUUV-N-Protein-Segmenten in das HBsAg keine VLPs in Hefezellen gebildet wurden (Dargeviciute, persönliche Mitteilung), konnten bei Insertion in das Hauptkapsidprotein VP1 des Hamsterpolyomavirus (siehe Gedvilaite et al., 2000; Gedvilaite, persönliche Mitteilung) und in das Coreantigen (Core) des HBV chimäre VLPs erhalten werden. Im weiteren sollen nur die Ergebnisse zur Herstellung von VLPs auf der Basis des HBV-Core dargestellt werden, da für chimäre Polyomavirus-abgeleitete VLPs bisher keine Daten zur Immunogenität vorliegen (siehe Abschnitt 10).

HBV-Core kann in verschiedenen heterologen Systemen, u. a. in *E. coli*, exprimiert werden und assembliert spontan zu VLPs. Neben den bereits oben genannten Vorteilen von VLPs besitzt das HBV-Core noch eine besondere Eigenschaft, nämlich die Fähigkeit nicht nur als T-Zell-abhängiges sondern auch als T-Zell-unabhängiges Antigen zu wirken (Milich et al., 1986), weshalb es in der Vergangenheit zu einem bevorzugten Träger für Fremdinsertionen geworden ist. In HBV-Core sind eine Vielzahl unterschiedlicher Fremdepitope aus viralen, bakteriellen und Parasiten-Antigenen eingebaut worden, die in verschiedenen Tiermodellen zur Induktion einer starken, z. T. protektiven Immunantwort führten (Übersicht in [14]). So sind z. B. vor kurzem auf der Basis von chimären HBV-Corepartikeln vielversprechende Influenza-virus- und Malariaimpfstoffe entwickelt worden (Neirynck et al., 1999; Sällberg et al., 2002).

Zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeiten waren aus experimentellen Untersuchungen verschiedener Gruppen zur Insertion von Fremdsequenzen 3 potentielle Insertionsorte im Core bekannt: am N-Terminus, in der immundominanten, sogenannten „c/e1-Region“ (AS-Positionen 78-82) und an unterschiedlichen C-terminalen Stellen (hinter AS 144, 149, 156 und 183). Während an einzelnen Orten unterschiedliche Fremdsequenzen inseriert worden waren, lagen bisher keine vergleichenden Daten zur Wertigkeit der einzelnen Orte (Insertionskapazität für Fremdsequenzen, Antigenität und Immunogenität des inserierten Fremdproteinabschnitts) bei Insertion der gleichen Fremdsequenz vor [14].

Aus diesem Grund sollten zunächst die bisher beschriebenen potentiellen Insertionsorte im HBV-Core (N-Terminus; c/e1-Region bei AS-Position 78; hinter C-terminaler AS-Position 144) unter Verwendung unterschiedlich langer Sequenzen untereinander hinsichtlich der

oben genannten Parameter verglichen werden. Dazu wurde zunächst ein Pentapeptid (DPAFR) aus dem preS1-Proteinabschnitt des HBV, gegen das ein mAk zur Verfügung stand, in die 3 genannten Orte inseriert. Während alle Core-Fusionsproteine mit DPAFR die Bildung von VLPs erlaubten, konnte nur bei N-terminaler Fusion und Insertion bei AS-Position 78 eine Oberflächenexposition und Zugänglichkeit des Epitops für den Antikörper beobachtet werden [5].

Die Daten dieser Untersuchungen wurden unter Verwendung von 2 unterschiedlich langen Segmenten des N-Proteins vom PUUV-Stamm Vranica/Hällnäs (AS 1-45 und 1-120) verifiziert: Während die Fusion des 45 AS langen Segments die Bildung von chimären Partikeln für alle Konstrukte erlaubte, wurden bei dem 120 AS langen Segment nur bei Insertion bei AS-Position 78 chimäre Partikel gefunden [6, 7]. Die für die Insertionen in Position 78 des Core beobachtete hohe Insertionskapazität steht in sehr guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten anderer Autoren. So konnten Kratz et al. (1999) zeigen, dass das „green fluorescent protein“ (GFP) mit einer Länge von 238 AS bei Insertion in die c/e1-Region zum Assembly fluoreszierender Corepartikel führt. In weiterführenden Untersuchungen haben wir jetzt gefunden, dass auch 120 N-terminale AS von N-Proteinen anderer Hantaviren (DOBV und HTNV) nach Insertion in die c/e1-Region die Partikelbildung von Core nicht stören. HBV-Core toleriert sogar die simultane Insertion von zwei, jeweils 120 AS langen Kopien des N-Proteins unterschiedlicher Hantaviren an AS-Position 78 des Core (z. B. HTNV + PUUV; Ulrich, Petrovskis, Shamil Musema, Gelderblom und Ose; unveröffentlichte Daten). Die hohe Insertionskapazität in der c/e1-Region lässt sich durch deren hohe Flexibilität begründen, die durch Strukturdaten aus cryoelektronenmikroskopischen und röntgenkristallografischen Untersuchungen (Böttcher et al., 1997; Wynne et al., 1999) und Epitopmapping-Daten belegt werden. Diese zeigten, dass die immundominante Region des Core, lokalisiert zwischen AS 78-82, in den Strukturanalysen durch Spikes an der Oberfläche von Core repräsentiert wird. Auch die Verwendbarkeit des N-Terminus von Core für die Fusion von Fremdsequenzen ist erfolgreich von verschiedenen Gruppen gezeigt worden (Übersicht in [14]).

Eine Erhöhung der Insertionskapazität bei C-terminalen Konstrukten (hinter AS 144) konnte durch Einführung eines flexiblen, Stopkodon-tragenden Linkers zwischen Core- und Fremdprotein-kodierender Sequenz erreicht werden, der in *E. coli*-Suppressorzellen, die eine UGA-Stopkodon/Tryptophan-Suppressor-tRNA besitzen, zur Co-Expression und zum nachfolgenden Co-Assembly von Core- und Core/PUUV-N-read-through-Protein führt ([4]; siehe

Abb. 1B). Diese Expressionsstrategie erlaubte auch die Bildung von Mosaikpartikeln, die den N-terminalen, 213 AS langen Abschnitt des N-Proteins von PUUV tragen. Möglicherweise erlaubt diese Methodik auch die Exposition von problematischen, z. B. hydrophoben, Fremdsequenzen an der Oberfläche von Corepartikeln (Kazaks et al., unveröffentlichte Daten). Da jedoch für Mosaikpartikel mit PUUV-N-Segmenten nur eine geringe bzw. keine protektive Immunantwort im Tiermodell induziert werden konnte [7, 8], wurden die Experimente zur Herstellung potentieller Vakzinen auf chimäre Partikel konzentriert. Möglicherweise können jedoch Mosaikpartikel, die durch simultane Expression von Core und Core-Fremdinsert-Fusionen (von zwei Genen auf unterschiedlichen Plasmiden kodiert) längere Fremdinsertionen tolerieren und die Induktion einer schützenden Immunantwort gegen die Fremdsequenz ermöglichen (Preikschat et al., 2000).

6. INDUKTION EINER PROTEKTIVEN IMMUNITÄT GEGEN HANTAVIREN IM RÖTELMAUSMODELL DURCH IMMUNISIERUNG MIT CHIMÄREN CORE-PARTIKELN

Zur Untersuchung der Induktion einer schützenden Immunantwort ist von der Gruppe um Åke Lundkvist in Stockholm ein Mausmodell etabliert worden (Lundkvist et al., 1996). Die Rötelmaus *Clethrionomys glareolus* ist der natürliche Reservoirwirt des PUUV und lässt sich experimentell durch subkutane Injektion eines PUUV-Wildtypstamms (Kazan) infizieren. Die Verwendung eines Wildtypstamms, der in der Rötelmaus angezüchtet wird, ist notwendig, da das PUUV bei Zellkulturpassage die Infektiosität für die Rötelmaus verliert, was wahrscheinlich auf Veränderungen in der nichtkodierenden Region des S-Segments des Virus zurückzuführen ist (Lundkvist et al., 1997b). Da die Infektion der Rötelmaus (Challenge) symptomlos verläuft, wurden bei Immunisierung mit N-Protein-Derivaten folgende Marker für den Schutz vor einer Hantavirusinfektion verwendet (Lundkvist et al., 1996; [9]):

- Abwesenheit von N-Protein in der Lunge (N-Protein-ELISA)
- Abwesenheit von G2-spezifischen Antikörpern (anti-G2-ELISA)
- keine Erhöhung des Titers N-Protein-spezifischer Antikörper (anti-N-ELISA)
- keine S-Segment spezifische RNA (RT-PCR).

Das Standard-Immunisierungsschema (Lundkvist et al., 1996) besteht in der subkutanen Injektion von 3 Dosen von je 50 µg gereinigten Proteins im Abstand von jeweils 3 Wochen,

wobei das Antigen mit komplettem Freund´schen Adjuvans (CFA, Primär-Immunisierung), inkomplettem Freund´schen Adjuvans (IFA; 1. Booster-Immunisierung) und PBS (2. Booster-Immunisierung) appliziert wurde. Zwei Wochen nach der letzten Impfung erfolgte der Virus-challenge, während nach 3 weiteren Wochen der Schutz vor einer Virusinfektion anhand der obengenannten Marker ermittelt wurde. Dabei wurde von uns die Abwesenheit aller Infektionsmarker als komplette Protektion gewertet, während das Auftreten einzelner Infektionsmarker als „partielle“ Protektion definiert wurde. Weiterführende Untersuchungen sind jedoch notwendig, um zu prüfen, ob „partiell“ geschützte Tiere noch Virus ausscheiden und somit infektiös sind.

In zwei unabhängigen Experimenten wurde die Induktion einer protektiven Immunantwort durch Immunisierung mit Corepartikeln, die AS 1-45 bzw. 75-119 des PUUV-CG18-20-N-Proteins tragen, untersucht [7, 10]: In beiden Experimenten konnte jeweils in 80 % der mit dem N-terminalen Segment immunisierten Tiere keine Expression des N-Antigens in der Lunge und keine G2-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, was auf eine vollständige Protektion gegen eine PUUV-Infektion hinweist. Dagegen war bei beiden Immunisierungsexperimenten mit Partikeln, die AS 75-119 von N tragen, jeweils nur ein Tier zumindest partiell geschützt.

Der Versuch durch simultanen Einbau der beiden N-Protein-Segmente in ein Coreproteinmolekül (AS 1-45 in c/e1-Region; AS 75-119 hinter AS 144 von Core) die protektive Wirkung auf 100 % der immunisierten Tiere zu erhöhen, wurde nicht erreicht: Nur 2 der 3 immunisierten Tiere wurden vollständig geschützt [8]. Sehr wahrscheinlich ist die Fusion an der C-terminalen Position des Core ungünstig für die Induktion einer protektiven Immunität, was durch weiterführende Untersuchungen unter Verwendung von N-Protein-Segmenten des PUUV-Vranica/Hällnäs bestätigt wurde (siehe Abschnitt 7). Mosaikpartikel mit C-terminaler Fusion von AS 1-114 dieses N-Proteins induzierten ebenfalls nur eine geringe Protektion [8].

7. DIE PROTEKTIVITÄT VON NUKLEOKAPSID-PROTEINABSCHNITTEN IST VON INSERTIONSORT IM COREPROTEIN UND DEM PUUMALAVIRUS-STAMM ABHÄNGIG

Wie bereits in Abschnitt 5 beschrieben, erlaubte die Insertion von 45 N-terminalen AS des N-Proteins vom PUUV-Stamm Vranica/Hällnäs die Bildung von chimären Corepartikeln bei Verwendung aller 3 untersuchten Insertionsorte (N-Terminus, AS-Position 78, C-terminal hinter AS 144). Außerdem sind Mosaikpartikel unter Ausnutzung des read-through-Systems (siehe Abschnitt 5; [4]) generiert worden, die die PUUV-N-Sequenz hinter AS 144 tragen. Interessanterweise beobachteten wir nur bei chimären Partikeln mit Insertionen am N-Terminus und bei AS-Position 78 die Induktion einer protektiven Immunantwort im Rötelmausmodell. Dagegen konnte bei Fusion von 45 AS des PUUV-Vranica/Hällnäs-N am C-Terminus, sowohl bei chimären als auch bei Mosaikpartikeln, keine Protektion gefunden werden [7].

Das Niveau der Protektivität, das durch die jeweils in AS-Position 78 des HBV-Core (c/e1-Region) inserierten 45 N-terminalen AS der N-Proteine der beiden PUUV-Stämme CG18-20 bzw. Vranica/Hällnäs gegenüber Challenge mit PUUV-Kazan erzeugt wurde, unterschied sich deutlich: Während bei Immunisierung mit dem CG18-20-Konstrukt 80 % der immunisierten Tiere vollständig geschützt wurden (siehe Abschnitt 6), führte das entsprechende Segment des Stamms Vranica/Hällnäs nur bei 40 % der Tiere zur Induktion einer partiellen Protektion. Bei Vergleich der Aminosäuresequenzen der N-Proteine von CG18-20, Vranica/Hällnäs und dem Challenge-Virus Kazan fielen die AS-Positionen 34 und 35 auf: Während die N-Proteine von CG18-20 und Kazan an diesen Positionen ein VD-Dipeptid besitzen, enthält das Vranica/Hällnäs-N-Protein die Sequenz MY. Daraus leiten wir die Vermutung ab, dass diese beiden AS-Positionen an der Induktion der protektiven Immunantwort maßgeblich beteiligt sind ([7]; siehe Abschnitte 9 und 10).

8. HEFE-EXPRIMIERTES PUUMALAVIRUS-NUKLEOKAPSIDPROTEIN ALS POTENTIELLE HANTAVIRUSVAKZINE

Als Alternative zu HBV-Core-abgeleiteten VLPs mit kurzen Abschnitten des PUUV-N-Proteins sollte auch komplettes N-Protein als potentielle Vakzine rekombinant hergestellt werden. Dazu wurde ein Hefeexpressionsplasmid pFX7 gewählt, mit dem bereits die Hochexpression des Hauptkapsidproteins VP1 des Hamsterpolyomavirus gelungen war (Sasnauskas et al., 1999). Ein wesentlicher Vorteil von *Saccharomyces cerevisiae* zur Herstellung einer potentiellen Hantavirusvakzine liegt vor allem darin, dass Hefezellen keine Endotoxine produzieren, die bei Anwendung beim Menschen unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen könnten. Außerdem ist *S. cerevisiae* genetisch sehr gut charakterisiert (vor kurzem wurde das komplette Genom aufgeklärt; es existieren verschiedenste Mutantenstämme) und lässt sich im biotechnologischen Maßstab kultivieren. Ferner basiert die erste für humane Anwendungen zugelassene rekombinante Vakzine auf dem in *S. cerevisiae* exprimierten HBsAg. Das oben genannte Expressionsplasmid besitzt noch den entscheidenden Vorteil, dass es eine Formaldehydresistenz vermittelt und deshalb beim Screening von rekombinanten Hefen keine Auxotrophiemutanten verwendet werden müssen.

Prinzipiell wurden zwei Varianten des PUUV (Vranica/Hällnäs)-N-Proteins hergestellt: authentisches N-Protein und ein N-Protein-Derivat mit N-terminalem Hexahistidinschwanz. Die beiden PUUV-N-Protein-Derivate konnten in *S. cerevisiae* in großen Mengen synthetisiert werden und wurden mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation bzw. Nickelchelat-Affinitätschromatografie gereinigt. Für beide Proteine konnten reproduzierbar große Ausbeuten erzielt werden (1,5 bzw. 1,25 mg gereinigtes Protein pro g Feuchtgewicht Hefezellen; das entspricht 15-18 mg bzw. 12-15 mg Protein pro Liter Kulturvolumen; [9]). Inzwischen konnten wir zeigen, dass auch die N-Proteine verschiedener anderer Stämme des PUUV (Kazan, Sotkamo) und anderer Hantavirus-Species (HTNV, DOBV) in *S. cerevisiae* in großen Mengen synthetisiert werden können (Dargeviciute et al., unveröffentlichte Daten).

Die Antigenität der PUUV-Vranica/Hällnäs-N-Proteine wurde im ELISA unter Verwendung eines Panels PUUV-N-spezifischer mAks charakterisiert. Während das authentische, Cäsiumchlorid-gereinigte N-Protein mit allen Antikörpern reagierte, wurde beim unter denaturierenden Bedingungen gereinigten Derivat mit Histidinschwanz eine fehlende Reaktion mit

dem mAk 5F4 beobachtet. Die Wiederherstellung der Reaktivität mit diesem Antikörper durch Verwendung einer anderen Reinigungsmethode (Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-zentrifugation) deutete darauf hin, dass nicht der Histidin-Schwanz, sondern die Reinigungs-methode die fehlende Reaktivität mit 5F4 verursacht hat [9].

Zunächst wurden Rötelmäuse nach Standard-Protokoll (siehe Abschnitt 6) mit den Hefe-exprimierten PUUV-N-Proteinen immunisiert. Während bei Immunisierung mit authentischem, Cäsiumchlorid-gereinigtem N-Protein nur 2 von 6 Tieren vollständig gegen einen nachfolgenden PUUV-Challenge geschützt waren, waren alle 12 mit dem Histidin-geschwänzten Derivat vakzinierten Tiere komplett vor der Virusinfektion geschützt. Bei Modifikation des Impfschemas, indem anstelle von CFA und IFA das für humane Immunisierungen zugelassene Aluminiumhydroxid als Adjuvans verwendet wurde, zeigten alle immunisierten Tiere eine zumindest partielle Protektion, wobei 6 von 8 Tieren komplett geschützt waren [9].

9. KARTIERUNG VON EPITOPEN UND IDENTIFIKATION VON PROTEKTIVEN REGIONEN IM NUKLEOKAPSIDPROTEIN

N-Protein-spezifische mAks rufen *in vitro* im FRNT keine Hemmung der Hantavirus-Replikation hervor [11]. Dagegen war von Åke Lundvist bei passivem Transfer von N-Protein-spezifischen mAks (1C12, 5E1, 3G5 und 5F4) in Rötelmäusen eine Protektion beobachtet worden, während andere mAks (4C3, 2E12, 3H9) keine Protektion vermittelten (siehe Tabelle 1; Lundkvist, persönliche Mitteilung). Deshalb sollten mit Hilfe verschiedener rekombinanter PUUV-N-Proteine, chimärer HBV-Corepartikel und synthetischer Peptide die Epitope der unterschiedlichen mAks kartiert werden. Neben den 11 verschiedenen Antikörpern, die durch Infektion von Rötelmäusen mit PUUV (Stamm Sotkamo) erhalten worden waren, wurde auch ein mAk (A1C5), der durch Immunisierung einer Maus mit rekombinantem PUUV-CG18-20-N-Protein hergestellt worden war, beim Epitopmapping eingesetzt [11].

Die Mehrzahl der getesteten mAks (9 von 12) reagierten im ELISA mit den kompletten N-Proteinen der PUUV-Stämme Vranica/Hällnäs und CG18-20. Ein Antikörper (5A3) reagierte ausschließlich mit dem N-Protein von CG18-20, jedoch nicht mit dem korrespondierenden Protein von Vranica/Hällnäs. Die Antikörper 3H9 und 5F4 reagierten mit keinem der rekombinanten Proteine; die Epitope dieser Antikörper konnten jedoch mit Hilfe synthetischer

Peptide zwischen den AS 247-263 bzw. AS 262-284 lokalisiert werden. Möglicherweise sind diese Abschnitte der N-Proteine im kompletten, *E. coli*-exprimierten N-Protein für die Antikörper nicht zugänglich [11].

Durch Verwendung kürzerer, partiell überlappender rekombinanter N-Protein-Derivate konnte die Lage der Epitope der Antikörper weiter eingegrenzt werden: Der mAk A1C5 war der einzige Antikörper, dessen Epitop in der Region AS 14-39 des N-Proteins kartiert wurde. Diese unikale Epitoplokalisation ist möglicherweise aus der Herstellung des Antikörpers zu erklären; A1C5 ist der einzige Antikörper, der durch Immunisierung mit rekombinantem Antigen hergestellt worden ist. Die Epitope der Antikörper 5E1, 3G5, 5B5, 2E12 und 4E5 konnten nur den N-Protein-Segmenten AS 1-80 bzw. AS 14-80 zugeordnet werden [11].

Tabelle 1:

Übersicht über die Epitoplokalisation und Vermittlung einer protektiven Immunität in Rötelmäusen durch passiven Transfer von PUUV-N-spezifischen mAks

mAk	Epitoplokalisation im N-Protein (AS-Positionen) [1]	Protektion im Rötelmausmodell nach passivem Transfer des mAk [2,3]
A1C5	14-39	n.d.
1C12	14-45/80 [4]	2/4
3E11	14-45/80 [4]	n.d.
4C3	14-45/80 [4]	0/4
5A3	14-45	n.d.
5E1	1-80	1/4
3G5	1-80	3/4
2E12	14-80	0/4
5B5	14-80	n.d.
4E5	14-80	n.d.
3H9	247-263	0/4
5F4	262-284	1/4

[1] entnommen aus [11]

[2] Lundkvist (persönliche Mitteilung)

[3] Anzahl der PUUV-N-Antigen-negativen Tiere/ Gesamtzahl der immunisierten Tiere (passiver Transfer von 0,5 mg der gereinigten mAks)

[4] Der mAk reagierte mit PUUV (Stamm CG18-20) -N-Protein AS 1-45 und AS 14-119 (Epitoplokalisation AS 14-45). Während der mAk mit dem N-Protein-Segment AS 1-80 von PUUV-Vranica/Hällnäs reaktiv war, wurde mit den AS 1-45 von Vranica/Hällnäs-N keine Reaktivität beobachtet. Durch Einführung eines AS-Austausches an Position 35 (D anstelle von Y) von Vranica/Hällnäs-N-Protein konnte die Reaktivität des mAk mit dem N-Proteinsegment AS 1-45 wiederhergestellt werden.

n.d., nicht durchgeführt

Die 3 mAks 1C12, 4C3 und 3E11, die sowohl mit dem vollständigen N-Protein von PUUV-CG18-20 als auch mit dem von PUUV-Vranica/Hällnäs kreuzreaktiv waren, reagierten mit dem N-Protein-Segment AS 1-45 von CG18-20. Interessanterweise wurde dagegen das entsprechende Segment des N-Proteins von Vranica/Hällnäs durch diese mAks nicht erkannt. Bei Aminosäuresequenzvergleich der N-Proteine der PUUV-Stämme Sotkamo, CG18-20 und Vranica/Hällnäs zeigte sich, dass die Aminosäuren 34/35 des N-Proteins (VD, VD, MY) für diese Unterschiede in der Reaktivität verantwortlich zu sein scheinen, was durch die Wiederherstellung der Reaktivität der mAks bei Veränderung der AS-Position 35 in Vranica/Hällnäs N AS 1-45 bestätigt wurde (AS-Austausch von Y zu D). Bemerkenswert war die Fähigkeit der Antikörper, im Gegensatz zur fehlenden Reaktivität mit dem Vranica/Hällnäs-N-Segment AS 1-45, mit den C-terminal verlängerten Segmenten AS 1-80 und AS 1-120 zu reagieren. Sehr wahrscheinlich sind die Antikörper gegen diskontinuierliche Epitope gerichtet, die möglicherweise zwei Bindungsregionen zwischen AS 1-45 und AS 46-80 erfordern. In Übereinstimmung damit zeigten die mAks 1C12 und 4C3 im PepScan keine Reaktion mit überlappenden synthetischen Peptiden aus diesen Regionen [11]. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist der Befund, dass der mAk 4C3 gegen die gleiche Region im N-Protein wie 1C12 gerichtet ist, jedoch bei passivem Transfer, im Gegensatz zu 1C12, keine schützende Immunität vermittelt, bisher nicht zu erklären.

Aus den Untersuchungen von Lundkvist et al. (1996) und den hier in den Abschnitten 6 und 7 beschriebenen Untersuchungen, den passiven mAk-Transferversuchen und den Epitopmappingstudien können zwei protektive Regionen im PUUV-N-Protein abgeleitet werden:

(i) am N-Terminus und

(ii) in einer mehr C-terminal lokalisierten Region des PUUV-N-Proteins.

(i) Am N-Terminus des N-Proteins konnte eine hauptprotektive Determinante im PUUV-CG18-20-N-Protein in den 45 N-terminalen AS identifiziert werden. Eine zweite protektive Region wurde zwischen den AS 75-119 lokalisiert [10]. Das Vorhandensein von mindestens 2 protektiven Regionen in den N-terminalen 120 AS von PUUV-N wurde auch durch Vergleich der Protektivität von 45 und 120 AS des PUUV-Vranica/Hällnäs-N-Proteins bestätigt: Während bei Immunisierung mit den 45 N-terminalen AS nur 40 % der Tiere partiell geschützt waren, wurden bei Immunisierung mit dem längeren Segment 7 der 8 immunisierten Tiere vollständig vor einem nachfolgenden PUUV-Challenge geschützt (Koletzki et al., in Vorbe-

reitung). Interessanterweise zeigten 3 mAks (1C12, 5E1, 3G5), die gegen verschiedene N-terminale Epitope im PUUV-N-Protein gerichtet sind, bei passiven Transferexperimenten im Rötelmausmodell eine Protektion (Tabelle 1). In Übereinstimmung mit den hier dargestellten Ergebnissen konnte auch bei passivem Transfer von 2 HTNV-N-Protein-spezifischen mAks, deren Epitope in der N-terminalen Hälfte des N-Proteins (AS 1-103, AS 166-175) lokalisiert sind, in einem Mausmodell eine protektive Immunantwort gefunden werden (Yoshimatsu et al., 1993, 1996).

(ii) Eine weitere protektive Region ist zwischen den AS 229-327 lokalisiert worden (Lundkvist et al., 1996). Diese Region enthält den Abschnitt AS 262-284, gegen den der mAk 5F4 gerichtet ist, der bei passivem Transfer eine schützende Immunität vermittelte (Tabelle 1). Ein mit der genannten protektiven Region überlappendes Epitop im HTNV-N-Protein, gegen das ein Protektion-vermittelnder mAk gerichtet ist, konnte zwischen den AS 290-402 identifiziert werden (Yoshimatsu et al., 1996).

10. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Zusammenfassend konnte in den hier dargestellten Untersuchungen gezeigt werden, dass in Mitteleuropa die humanpathogenen Hantavirus-Species PUUV und DOBV vorkommen. Darüber hinaus konnte in Mitteleuropa die sympatrische Existenz von 2 DOBV-Linien, DOBV-Aa und DOB-Af, nachgewiesen werden. Die Viren werden von unterschiedlichen Nagetierwirten (*A. agrarius* und *A. flavicollis*) getragen und sind möglicherweise unterschiedlich virulent für den Menschen. Daneben gibt es erste Hinweise, dass auch TULV humane Infektionen hervorrufen kann und möglicherweise, entgegen bisherigen Annahmen, auch unter bestimmten Umständen humanpathogen sein kann (Schultze et al., 2002; Meisel, Ziaja, Krüger und Ulrich, unveröffentlichte Daten).

Chimäre HBV-Corepartikel und Hefe-exprimierte rekombinante PUUV-N-Protein-Derivate stellen hoffnungsvolle Impfstoffkandidaten dar, die im Rötelmausmodell eine schützende Immunantwort induzieren können. Eine hauptprotektive Determinante konnte im N-Protein zwischen AS 1-45 lokalisiert werden; eine zweite, schwach protektive Determinante ist zwischen AS 75-119 lokalisiert. PUUV-Stamm-spezifische Unterschiede in der Induktion einer schützenden Immunantwort im Rötelmausmodell verdeutlichten die Bedeutung der AS 34/35 im N-Protein für die Protektion. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit den Daten zur

Epitoplokalisation des *in vivo* protektiven, PUUV-N-spezifischen mAks 1C12. Die schwache Protektivität des PUUV-Vranica/Hällnäs-N-Segments AS 1-45 konnte durch Verwendung eines längeren Segments (AS 1-120) deutlich verbessert werden. Das Hefe-exprimierte PUUV-Vranica/Hällnäs-N-Protein mit N-terminalem Hexahistidinschwanz induzierte im Rötelmausmodell bei Anwendung eines Standardimmunisierungsprotokolls unter Verwendung von komplettem Freund´schen Adjuvans eine schützende Immunität in allen vakzinierten Tieren. Bei Verwendung von Aluminiumhydroxid, einem für humane Anwendungen zugelassenen Adjuvans, wurden 100 % der immunisierten Tiere mindestens partiell, darunter 75 % der Tiere sogar komplett, vor einem nachfolgenden Viruschallenge geschützt. Passive Immunisierungsexperimente und Epitopmappingstudien deuten darauf hin, dass nicht nur zelluläre, sondern auch humorale N-Protein-spezifische Immunantworten an der Induktion einer schützenden Immunität beteiligt sein könnten.

Die hier dargestellten Daten zur Induktion einer schützenden Immunantwort durch rekombinante Hantavirus-N-Protein-Derivate stehen in Übereinstimmung mit Daten anderer Autoren (Schmaljohn et al., 1990, 1999; Xu et al., 1992; Yoshimatsu et al., 1993; Lundkvist et al., 1996). Eine protektive Immunität konnte in Tiermodellen auch durch Immunisierung mit rekombinanten internen Proteinen oder entsprechenden DNA-Vakzinekonstrukten anderer umhüllter Viren, wie z. B. Coreprotein von HBV (Murray et al., 1987) und Waldmurmeltier-Hepatitisvirus (woodchuck hepatitis virus, WHV; Schödel et al., 1993), Nukleoprotein von Influenza A Virus (Ulmer et al., 1993) und Tollwutvirus (Fu et al., 1991), erzielt werden.

Da es sich beim N-Protein um ein internes Protein handelt, liegt es nahe, dass die induzierte Protektion durch eine zelluläre Immunantwort vermittelt wird. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein Ebolavirus-Nukleoprotein-kodierendes Replikon auf der Basis des Venezolanischen Equinen Encephalitisvirus (VEEV) in einem Mausmodell zur Induktion cytotoxischer T-Zellen führt, die eine schützende Immunantwort vermitteln (Wilson and Hart, 2001). Zur Induktion zellulärer Immunantworten gegen Hantaviren liegen Daten aus Untersuchungen verschiedener Autoren an Mausmodellen und infizierten Patienten vor. So konnten CD4- und CD8-positive cytotoxische T-Lymphocyten (CTL) bei Sin nombre Virus- und HTNV-infizierten Personen identifiziert werden, die gegen unterschiedliche Epitope im N-Protein gerichtet sind. Die funktionelle Bedeutung dieser CTLs bei der Eliminierung Hantavirus-infizierter Zellen und/oder Virus-induzierten Immunpathogenese müssen weitere Untersuchungen zeigen (Ennis et al., 1997; van Epps et al., 1999). Durch *in vivo*-Transfer von

Milzzellen HTNV-infizierter BALB/c-Mäuse und *in vitro* CTL-Assays unter Verwendung dieser Zellen konnte gezeigt werden, dass CD8-positive CTLs bedeutsam für die Eliminierung Hantavirus-infizierter Zellen sind (Asada et al., 1987, 1988). Kreuzprotektionsexperimente in Nacktmäusen und entsprechende CTL-Assays mit HTNV, PUUV und Prospect-Hill-Virus deuteten darauf hin, dass die CTLs möglicherweise gegen N-Protein gerichtet sind (Asada et al., 1989).

Einen ersten direkten Hinweis, dass das N-Protein von HTNV an der Induktion einer protektiven CTL-Antwort beteiligt ist, fanden Yoshimatsu et al. (1993) in einem Mausmodell. In diesen Untersuchungen vermittelte eine T-Zell-angereicherte Fraktion von Milzzellen aus HTNV-N-Protein-immunisierten Mäusen, die einen Tag nach HTNV-Infektion auf neugeborene Mäuse transferiert wurde, in einem von 7 Tieren eine schützende Immunität.

Neben CD8-positiven CTLs sind auch CD4-positive T-Lymphocyten für die Induktion einer protektiven Immunität von Bedeutung (Asada et al., 1987). Bei Untersuchungen im BALB/c-Mausmodell konnten im N-Protein von PUUV mehrere T-Helfer-Zell-Epitope bei AS 6-27, AS 96-117, AS 211-232 und AS 256-277 kartiert werden (de Carvalho Nicacio et al., 2001).

Aus den hier vorgestellten Daten (Abschnitte 6-9) leiten wir die Arbeitshypothese ab, dass die N-Protein-vermittelte Protektion, neben einer zellulären Immunantwort, auch durch Induktion einer humoralen Immunantwort vermittelt wird. Dabei scheinen für die Induktion einer protektiven humoralen Immunität die Regionen bei AS-Position 34/35 und zwischen AS 262-284 von Bedeutung zu sein.

Die in dieser Arbeit dargestellten Hinweise zu einer möglichen Beteiligung der N-Protein-spezifischen Antikörperantwort an der Induktion einer schützenden Immunität stehen in Übereinstimmung mit Daten von Yoshimatsu et al. (1993, 1996), die bei passivem Transfer von HTNV-N-Protein-spezifischen mAks in neugeborenen Mäusen einen Schutz und in der Zellkultur eine Hemmung der Virusreplikation beobachteten (Yoshimatsu et al., 1993, 1996). Ähnliche Daten zur *in vitro*-Hemmung der Virusreplikation wurden für mAks berichtet, die gegen p17 und p24 von HIV-1 sowie Tollwutvirus-Nukleoprotein und -Nichtstrukturprotein hergestellt worden sind (Papsidero et al., 1989; Franke et al., 1992; Lafon and Lafage, 1987).

Die antivirale Wirkung von Virus-neutralisierenden Antikörpern gegen äußere virale Proteine beruht vor allem auf ihrer Virus-neutralisierenden Aktivität, d. h. der Inaktivierung

und Eliminierung von freien Viruspartikeln in Körperflüssigkeiten. Daneben können Virus-neutralisierende, aber auch nicht-neutralisierende Antikörper, über Fc-vermittelte Effektorsysteme (Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität, ADCC; Komplement-abhängige Zytotoxizität) zu Lyse oder „clearance“ von Virus-infizierten Zellen führen (Burton, 2002). Antikörper, die gegen interne Proteine eines Virus gerichtet sind, können freie Viruspartikel nicht neutralisieren, da das Antigen für den Antikörper nicht zugänglich ist. Sehr wahrscheinlich beruht die antivirale Wirkung solcher nicht-neutralisierenden Antikörper auf einer ADCC-Antwort, die zur Zerstörung Virus-infizierter Zellen und zur Verhinderung der Zell-Zell-Ausbreitung von Viren führt. Dabei binden zunächst die Virus-spezifischen Antikörper an Virusantigene, die an der Oberfläche Virus-infizierter Zellen lokalisiert sind. Der Fc-Teil des Antikörpers wird von Fc-Rezeptoren von ADCC-Effektorzellen, d. h. vor allem natürlichen Killer (NK)-Zellen, erkannt und gebunden. Diese Interaktion führt letztendlich zur Lyse oder Apoptose der Virus-infizierten Zelle. Somit setzt eine ADCC-Antwort die Lokalisation von Virusantigen an der Oberfläche von Virus-infizierten Zellen voraus, was z. B. für das interne p24-Protein von HIV-1 (Franke et al., 1992) und Hüllproteine von Hantaviren beobachtet wurde, jedoch für N-Protein von Hantaviren noch nicht zweifelsfrei gezeigt werden konnte (Yoshimatsu et al., 1993). Es gibt zunehmend auch Hinweise, dass ADCC eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der Virämie während der HIV-Infektion spielt (Forthal et al., 2001).

Als eine zweite Möglichkeit der antiviralen Wirkung von Antikörpern, die gegen interne Virusproteine gerichtet sind, wird eine intrazelluläre Wirkung diskutiert. So konnte bei Verwendung einer speziellen Behandlungsmethode von Zellen (sogenanntes „scrape-loading“) mit mAks, die gegen Tollwut-Nukleoprotein und -Nichtstrukturprotein sowie Hantavirus-N-Protein gerichtet sind, eine Inhibition der Virusreplikation beobachtet werden. Dabei wurden die Antikörper zu Zellen dazugegeben, die mechanisch von der Oberfläche einer Petrischale oder Zellkulturflasche abgehoben worden sind (Lafon and Lafage, 1987; Yoshimatsu et al., 1996). Als Mechanismen der Hemmung der Virusreplikation wurden eine intrazelluläre Bindung an neusynthetisierte Virusproteine oder eine Beeinträchtigung der initialen Transkription diskutiert (Lafon and Lafage, 1987).

Die hier zusammengefassten Untersuchungen sollen in folgende Richtungen fortgesetzt werden:

1) Unsere gegenwärtige Arbeitshypothese besagt, dass milde klinische Verläufe des HFRS in Mittel- und Osteuropa durch Infektionen mit DOBV-Aa verursacht werden. Dagegen werden schwere klinische Verläufe in Süd- und Südosteuropa wahrscheinlich durch Infektionen mit DOBV-Af verursacht. Diese Annahme soll durch weiterführende serologische und molekulargenetische Untersuchungen in Deutschland und Litauen überprüft werden. So wird gegenwärtig in einem gemeinsamen Projekt mit dem Robert Koch-Institut die Seroprävalenz von Hantavirus-spezifischen Antikörpern in der deutschen Bevölkerung anhand eines repräsentativen Serumpanels (ca. 6500 Seren, Bundesgesundheitssurvey) charakterisiert.

2) Die Wertigkeit der hier vorgestellten Vakzinekandidaten soll in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Åke Lundkvist in Stockholm in einem neu etablierten Primatenmodell (Klingström et al., 2002) getestet werden. Dabei wird es nicht nur auf die Applikationsform und verwendete Dosis des Antigens, sondern auch auf die Optimierung des Adjuvans ankommen. Diese Untersuchungen stehen in engem Zusammenhang mit den unter 4) genannten Experimenten zur Charakterisierung der durch das N-Protein vermittelten Immunantwort. Außerdem soll geprüft werden, inwieweit eine bereits existierende anti-HBV-Core-Immunität die Immunantwort gegen chimäre HBV-Corepartikel beeinflusst.

3) Zur Abklärung der Bedeutung der partikulären Struktur von HBV-Core für die Induktion einer protektiven Immunität wurde bereits die Protektivität von nativen und denaturierten chimären Corepartikeln sowie N-Protein AS 1-120 im Rötelmausmodell untersucht, wobei keine auffälligen Unterschiede zwischen den beiden Core-Varianten beobachtet wurden (Koletzki et al., in Vorbereitung). Da jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass denaturiertes Core vor der Immunisierung wieder re-assembliert, sollen ähnliche Experimente durchgeführt werden, bei denen Assembly-kompetentes (AS 1-149) und –inkompetentes Core (AS 1-124), jeweils mit Insertion des PUUV-N-Proteinsegments in der c/e1-Region, bezüglich ihrer Immunogenität und Protektivität gegen einen nachfolgenden Hantaviruschallenge im Rötelmausmodell verglichen werden.

4) Ausgehend von der Arbeitshypothese, dass die N-Protein-vermittelte Protektion im Tiermodell neben einer zellulären (CTL) auch eine humorale Immunantwort (ADCC) beinhaltet, werden Immunisierungen mit den genannten chimären Core-VLPs und Hefe-exprimierten rekombinanten N-Proteinen durchgeführt und die induzierten humoralen und zellulären Immunantworten charakterisiert. Dazu werden gegenwärtig zunächst immunologische Tests zum Nachweis von T-Zellantworten in BALB/c- und C57BL/6-Mäusen etabliert (T-Zell-Proliferation, CTL-Assays). Die Vermutung, dass AS-Position 35 des PUUV-N-Proteins eine entscheidende Bedeutung für die Induktion einer schützenden Immunität besitzt, wird gegenwärtig im Rötelmausmodell durch Immunisierungsexperimente mit chimären Polyomavirus-VP1-VLPs untersucht, die die 45 N-terminalen AS des N-Proteins von PUUV-Vranica/Hällnäs (AS-Position 35: Y) bzw. des entsprechenden Segments mit veränderter AS 35 (D anstelle von Y) tragen.

11. LITERATURVERZEICHNIS

11.1. Eigene Veröffentlichungen

[1-11] Originalarbeiten; [12-14] Übersichtsarbeiten

[1] SIBOLD, C., MEISEL, H., LUNDKVIST, Å., SCHULZ, A., CIFIRE, F., ULRICH, R., KOZUCH, O., LABUDA, M. AND KRÜGER, D.H. (1999). Simultaneous occurrence of Dobrava, Puumala, and Tula hantaviruses in Slovakia. Am. J. Trop. Med. Hyg. **61**, 409-411.

[2] SIBOLD, C., ULRICH, R., LABUDA, M., LUNDKVIST, Å., MARTENS, H., SCHÜTT, M., GERKE, P., LEITMEYER, K., MEISEL, H. AND KRÜGER, D.H. (2001). Dobrava hantavirus causes hemorrhagic fever with renal syndrome in central Europe and is carried by two different Apodemus mice species. J. Med. Virol. **63**, 158-167.

[3] HEIDER, H., ZIAJA, B., PRIEMER, C., LUNDKVIST, Å., NEYTS, J., KRÜGER, D.H. AND ULRICH, R. (2001). A chemiluminescent detection method of hantaviral antigens in neutralisation assays and inhibitor studies. J. Virol. Methods **96**, 17-23.

[4] KOLETZKI, D., ZANKL, A., GELDERBLOM, H.R., MEISEL, H., DISLERS, A., BORISOVA, G., PUMPENS, P., KRÜGER, D.H. AND ULRICH, R. (1997). Mosaic hepatitis B virus core particles allow insertion of extended foreign protein segments. J. Gen. Virol. **78**, 2049-2053.

[5] LACHMANN, S., MEISEL, H., MUSELMANN, C., KOLETZKI, D., GELDERBLOM, H.R., BORISOVA, G., KRÜGER, D.H., PUMPENS, P. AND ULRICH, R. (1999). Characterization of potential insertion sites in the core antigen of hepatitis B virus by the use of a short-sized model epitope. Intervirology **42**, 51-56.

[6] KOLETZKI, D., BIEL, S.S., MEISEL, H., NUGEL, E., GELDERBLOM, H.R., KRÜGER, D.H. AND ULRICH, R. (1999). HBV core particles allow the insertion and surface exposure of the entire potentially protective region of Puumala hantavirus nucleocapsid protein Biol. Chem. **380**, 325-333.

[7] KOLETZKI, D., LUNDKVIST, Å., BRUS SJÖLANDER, K., GELDERBLOM, H.R., NIEDRIG, M., MEISEL, H., KRÜGER, D.H. AND ULRICH, R. (2000). Puumala (PUU) hantavirus strain differences and insertion positions in the hepatitis B virus core antigen influence B-cell immunogenicity and protective potential of core-derived particles. Virology **276**, 364-375.

[8] ULRICH, R., KOLETZKI, D., LACHMANN, S., LUNDKVIST, Å., ZANKL, A., KAZAKS, A., KURTH, A., GELDERBLOM, H.R., BORISOVA, G.P., MEISEL, H. AND KRÜGER, D.H. (1999). New chimaeric hepatitis B virus core particles carrying hantavirus (serotype Puumala) epitopes: immunogenicity and protection against virus challenge. J. Biotechnol. **73,** 141-153.

[9] DARGEVICIUTE, A., BRUS SJÖLANDER, K., SASNAUSKAS, K., KRÜGER, D.H., MEISEL, H., ULRICH, R. AND LUNDKVIST, Å. (2002). Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model. Vaccine **20**, 3523-3531.

[10] ULRICH, R., LUNDKVIST, Å., MEISEL, H., KOLETZKI, D., BRUS SJÖLANDER, K., GELDERBLOM, H.R., BORISOVA, G., SCHNITZLER, P., DARAI, G. AND KRÜGER, D.H. (1998). Chimaeric HBV core particles carrying a defined segment of Puumala hantavirus nucleocapsid protein evoke protective immunity in an animal model. Vaccine **16**, 272-280.

[11] LUNDKVIST, Å., MEISEL, H., KOLETZKI, D., LANKINEN, H., CIFIRE, F., GELDMACHER, A., SIBOLD, C., GÖTT, P., VAHERI, A., KRÜGER, D.H. AND ULRICH, R. (2002). Mapping of B-cell epitopes in the nucleocapsid protein of Puumala hantavirus. Viral Immunology **15**, 177-192.

[12] KRÜGER, D.H., ULRICH, R. AND LUNDKVIST, Å. (2001). Hantavirus infections and their prevention. Microbes Infect. **3**, 1129-1144.

[13] ULRICH, R., HJELLE, B., PITRA, C. AND KRÜGER, D.H. (2002). Emerging viruses: The case “Hantavirus”. Intervirology **45**, 318-327.

[14] ULRICH, R., NASSAL, M., MEISEL, H. AND KRÜGER, D.H. (1998). Core particles of hepatitis B virus as carrier for foreign epitopes. Adv. Virus Res. **50**, 141-182.

11.2. Veröffentlichungen anderer Autoren

ARIKAWA, J., YAO, J.-S., YOSHIMATSU, K., TAKASHIMA, I. AND HASHIMOTO, N. (1992). Protective role of antigenic sites on the envelope protein of Hantaan virus defined by monoclonal antibodies. Arch. Virol**. 126**, 271-281.

ASADA, H., TAMURA, M., KONDO, K., OKUNO, Y., TAKAHASHI, Y., DOHI, Y., NAGAI, T., KURATA, T. AND YAMANISHI, K. (1987). Role of T lymphocyte subsets in protection and recovery from Hantaan virus infection in mice. J. Gen. Virol. **68**, 1961-1969.

ASADA, H., TAMURA, M., KONDO, K., DOHI, Y. AND YAMANISHI, K. (1988). Cell-mediated immunity to virus causing haemorrhagic fever with renal syndrome: Generation of cytotoxic T lymphocytes. J. Gen. Virol**. 69,** 2179-2188.

ASADA, H., BALACHANDRA, K., TAMURA, M., KONDO, K. AND YAMANISHI, K. (1989). Cross-reactive immunity among different serotypes of virus causing haemorrhagic fever with renal syndrome. J. Gen. Virol**. 70**, 819-825.

BÖTTCHER, B., WYNNE, S.A., AND CROWTHER, R.A. (1997). Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. Nature **386**, 88-91.

Bridgen, A., Weber, F., Fazakerley, J.K. and Elliott, R.M. (2001). Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 664-669.

BRUS SJÖLANDER, K., GOLOVLJOVA, I., PLYUSNIN, A. AND LUNDKVIST, Å. (2000). Diagnostic potential of Puumala virus nucleocapsid protein expressed in Drosophila melanogaster cells. J. Clin. Microbiol. **38,** 2324-2329.

BURTON, D.R. (2002). Antibodies, viruses and vaccines. Nature Reviews. Immunology. **2,** 706-713.

CHO, H.-W. AND HOWARD, C.R. (1999). Antibody responses in humans to an inactivated hantavirus vaccine (Hantavax R). Vaccine **17**, 2569-2575.

DAVIS, D., TRISCHMANN, H., STEPHENS, D.M. AND LACHMANN, P.J. (2001). Antibodies raised to short synthetic peptides with sequences derived from HIV-1 SF2 gp120 can both neutralize and enhance HIV-1 SF13: a later variant isolated from the same host. J. Med. Virol. **64,** 207-216.

DE CARVALHO NICACIO, C., SÄLLBERG, M., HULTGREN, C. AND LUNDKVIST, Å. (2001). T-helper and humoral responses to Puumala hantavirus nucleocapsid protein: Identification of T-helper epitopes in a mouse model. J. Gen. Virol**. 82**, 129-138.

DE CARVALHO NICACIO, C., GONZALEZ DELLA VALLE, M., PADULA, P., BJÖRLING, E., PLYUSNIN, A. AND LUNDKVIST, Å. (2002). Cross-protection against challenge with Puumala virus after immunization with nucleocapsid proteins from different hantaviruses. J. Virol. **76**, 6669-6677.

ENNIS, F.A., CRUZ, J., SPIROPOULOU, C.F., WAITE, D., PETERS, C.J., NICHOL, S.T., KARIWA, H. AND KOSTER, F.T. (1997). Hantavirus pulmonary syndrome: CD8+ and CD4+ cytotoxic T lymphocytes to epitopes on Sin nombre virus nucleocapsid protein isolated during acute illness. Virology **238**, 380-390.

FORTHAL, D.N., LANDUCCI, G. AND DAAR, E.S. (2001). Antibody from patients with acute human immunodeficiency virus (HIV) infection inhibits primary strains of HIV type 1 in the presence of natural-killer effector cells. J. Virol. **75**, 6953-6961.

FRANKE, L., GRUNOW, R., MEISSNER, K., PORSTMANN, T. AND VON BAEHR, R. (1992). Inhibition of HIV-1 infection in vitro by murine monoclonal anti-p24 antibodies. J. Med. Virol. **37**, 137-142.

FU, Z.F., DIETZSCHOLD, B., SCHUMACHER, C.L., WUNNER, W.H., ERTL, H.C.J. AND KOPROWSKI, H. (1991). Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 2001-2005.

GEDVILAITE, A., FRÖMMEL, C., SASNAUSKAS, K., MICHEEL, B., ÖZEL, M., BEHRSING, O., STANIULIS, J., JANDRIG, B., SCHERNECK, S. AND ULRICH, R. (2000). Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. Virology **273**, 21-35.

HOOPER, J. W., KAMRUD, K. I., ELGH, F., CUSTER, D. AND SCHMALJOHN, C.S. (1999). DNA vaccination with hantavirus M segment elicits neutralizing antibodies and protects against Seoul virus infection. Virology **255,** 269-278.

KEHM, R., JAKOB, N.J., WELZEL, T.M., TOBIASCH, E., VICZIAN, O., JOCK, S., GEIDER, K., SULE, S. AND DARAI, G. (2001). Expression of immunogenic Puumala virus nucleocapsid protein in transgenic tobacco and potato plants. Virus Genes **22,** 73-83.

KLINGSTRÖM, J., PLYUSNIN, A., VAHERI, A. AND LUNDKVIST, Å. (2002). Wild-type Puumala hantavirus infection induces cytokines, C-reactive protein, creatinine, and nitric oxide in cynomolgus macaques. J. Virol. **76**, 444-449.

KRATZ, P.A., BÖTTCHER, B. AND NASSAL, M. (1999). Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 1915-1920.

LAFON, M. AND LAFAGE, M. (1987). Antiviral activity of monoclonal antibodies specific for the internal proteins N and NS of Rabies virus. J. Gen. Virol. **68**, 3113-3123.

Lee, H.W., Lee, P.W. and Johnson, K.M. (1978). Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. J. Infect. Dis. **137**, 298-308.

LEE, H.W., CHU, Y.-K., WOO, Y.-D., AN, C.-N., KIM, H., TKACHENKO, E. AND GLIGIC, A. (1999). Vaccines against hemorrhagic fever with renal syndrome, In: Saluzzo J.F., Dodet B. (Eds.), Factors in the emergence and control of rodent-borne viral diseases (Hantaviral and arenaviral diseases), Elsevier, Amsterdam, pp. 147-156.

LEITMEYER, K., SIBOLD, C., MEISEL, H., ULRICH, R., LABUDA, M. AND KRÜGER, D.H. (2001). First molecular evidence for Puumala hantavirus in Slovakia. Virus Genes **23**, 165-169.

LUNDKVIST, Å. AND NIKLASSON, B. (1992). Bank vole monoclonal antibodies against Puumala virus envelope glycoproteins: identification of epitopes involved in neutralization. Arch. Virol. **126**, 93-105.

LUNDKVIST, Å., HÖRLING, J., ATHLIN, L., ROSEN, A. AND NIKLASSON, B. (1993). Neutralizing human monoclonal antibodies against Puumala virus, causative agent of nephropathia epidemica: A novel method using antigen-coated magnetic beads for specific B cell isolation. J. Gen. Virol. **74**, 1303-1310.

LUNDKVIST, Å., KALLIO-KOKKO, H., BRUS SJÖLANDER, K., LANKINEN, H., NIKLASSON, B., VAHERI, A. AND VAPALAHTI, O. (1996). Characterization of Puumala virus nucleocapsid protein: Identification of B-cell epitopes and domains involved in protective immunity. Virology **216,** 397-406.

LUNDKVIST, Å., HUKIC, M., HÖRLING, J., GILLJAM, M., NICHOL, S., AND NIKLASSON, B. (1997a). Puumala and Dobrava viruses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Hercegovina: evidence of highly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera. J. Med. Virol**. 53**, 51-59.

LUNDKVIST, Å., CHENG, Y., BRUS SJÖLANDER, K., NIKLASSON, B., VAHERI, A. AND PLYUSNIN, A. (1997b). Cell culture adaptation of Puumala hantavirus changes the infectivity for its natural reservoir, Clethrionomys glareolus, and leads to accumulation of mutants with altered genomic RNA S segment. J. Virol. **71**, 9515-9523.

MCCLAIN, D.J., SUMMERS, P.L., HARRISON, S.A., SCHMALJOHN, A.L. AND SCHMALJOHN, C.S. (2000). Clinical evaluation of a vaccinia-vectored Hantaan virus vaccine. J. Med. Virol**. 60**, 77-85.

MILICH, D.R. AND MCLACHLAN, A. (1986) The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell independent and a T-cell dependent antigen. Science **234**, 1398-1401.

MURRAY, K., BRUCE, S.A., WINGFIELD, P., VAN EERD, P., DE REUS, A. AND SCHELLEKENS, H. (1987). Protective immunisation against hepatitis B with an internal antigen of the virus. J. Med. Virol**. 23,** 101-107**.**

NEIRYNCK, S., DEROO, T., SAELENS, X., VANLANDSCHOOT, P., JOU, W.M. AND FIERS, W. (1999**).** A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein**.** Nature Medicine **5**, 1157-1163**.**

PADULA, P.J., EDELSTEIN, A., MIGUEL, S.D.L., LÓPEZ, N.M., ROSSI, C.M. AND RABINOVICH, R.D. (1998). Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: Molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. Virology **241**, 323-330.

PAPA, A., JOHNSON, A.M., STOCKTON, P.C., BOWEN, M.D., SPIROPOULOU, C.F., ALEXIOU-DANIEL, S., KSIAZEK, T.G., NICHOL, S.T. AND ANTONIADIS, A. (1998). Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece. J. Med. Virol**. 55,** 321-327.

PAPSIDERO, L.D., SHEU, M. AND RUSCETTI, F.W. (1989). Human Immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibodies which react with p17 core protein: characterization and epitope mapping. J. Virol**. 63**, 267-272.

PREIKSCHAT, P., KAZAKS, A., DISHLERS, A., PUMPENS, P., KRÜGER, D.H. AND MEISEL, H. (2000). Interaction of wild-type and naturally occuring deleted variants of hepatitis B virus core polypeptides leads to formation of mosaic particles. FEBS Letters **478**, 127-132.

REIP, A., HARING, B., SIBOLD, C., STOHWASSER, R., BAUTZ, E.K.F., DARAI, G., MEISEL, H. AND KRÜGER, D.H. (1995). Coding strategy of the S and M genomic segments of a hantavirus representing a new subtype of the Puumala serotype. Arch. Virol**. 140**, 2011-2026.

SÄLLBERG, M., HUGHES, J., JONES, J., PHILLIPS, T. R. AND MILICH D. R. (2002). A malaria vaccine candidate based on an HBV core platform. Intervirology **45,** 350-361.

SASNAUSKAS, K., BUZAITE, O., VOGEL, F., JANDRIG, B., RAZANSKAS, R., STANIULIS, J., SCHERNECK, S., KRÜGER, D.H. AND ULRICH, R. (1999). Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. Biol. Chem. **380**, 381-386.

SCHMALJOHN, C.S., CHU, Y.K., SCHMALJOHN, A.L. AND DALRYMPLE, J.M. (1990). Antigenic subunits of Hantaan virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants. J. Virol**. 64**, 3162-3170.

SCHMALJOHN, C., KAMRUD, K. AND HOOPER, J. (1999). Recombinant DNA vaccines for hantaviruses, In: Saluzzo J.F., Dodet B. (Eds.), Factors in the emergence and control of rodent-borne viral diseases (Hantaviral and arenaviral diseases), Elsevier, Amsterdam, pp. 163-173.

SCHÖDEL, F., NECKERMANN, G., PETERSON, D., FUCHS, K., FULLER, S., WILL, H. AND ROGGENDORF, M. (1993). Immunization with recombinant woodchuck hepatitis virus nucleocapsid antigen or hepatitis B virus nucleocapsid antigen protects woodchucks from woodchuck hepatitis virus infection. Vaccine **11**, 624-628.

SCHULTZE, D., LUNDKVIST, Å., BLAUENSTEIN, U. AND HEYMAN, P. (2002). Tula virus infection associated with fever and exanthema after a wild rodent bite. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **21**, 304-306.

STOHWASSER, R., GIEBEL, L.B., ZÖLLER, L., BAUTZ, E.K.F. AND DARAI, G. (1990). Molecular characterization of the RNA S segment of Nephropathia epidemica virus strain Hällnäs B1. Virology **174**, 79-86.

ULMER, J.B., DONNELLY, J.J., PARKER, S.E., RHODES, G.H., FELGNER, P.L., DWARKI, V.J., GROMKOWSKI, S.H., DECK, R.R., DEWITT, C.M., FRIEDMAN, A., HAWE, L.A., LEANDER, K.R., MARTINEZ, D., PERRY, H.C., SHIVER, J.W., MONTGOMERY, D.L. AND LIU, M.A. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science **259**, 1745-1749.

ULRICH, R., GERLICH, W. AND KRÜGER, D.H. (1996). Chimaera and its modern virus-like descendants. Intervirology **39,** 126-132.

VAN EPPS, H.L., SCHMALJOHN, C.S. AND ENNIS, F.A. (1999). Human memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses to Hantaan virus infection: identification of virus-specific and cross-reactive CD8+ CTL epitopes on nucleocapsid protein. J. Virol. **73**, 5301-5308.

VAPALAHTI, O., LUNDKVIST, Å., KALLIO-KOKKO, H., PAUKKU, K., JULKUNEN, I., LANKINEN, H. AND VAHERI, A. (1996). Antigenic properties and diagnostic potential of Puumala virus nucleocapsid protein expressed in insect cells. J. Clin. Microbiol. **34**, 119-125.

WEBER, F., BRIDGEN, A., FAZAKERLEY, J.K., STREITENFELD, H., KESSLER, N., RANDALL, R.E. AND ELLIOTT, R.M. (2002). Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs counteracts the induction of alpha/beta interferon. J. Virol. **76**, 7949-7955.

WILSON, J.A. AND HART, M.K. (2001). Protection from Ebola virus mediated by cytotoxic T lymphocytes specific for the viral nucleoprotein. J. Virol. **75**, 2660-2664.

WYNNE, S.A., CROWTHER, R.A. AND LESLIE, A.G. (1999). The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. Mol. Cell **3**, 771-780.

XU, X., RUO, S.L., MCCORMICK, J.B. AND FISHER-HOCH, S.P. (1992). Immunity to hantavirus challenge in Meriones unguiculatus induced by vaccinia-vectored viral proteins. Am. J. Trop. Med. Hyg**. 47**, 397-404.

YAO, J.-S., KARIWA, H., TAKASHIMA, I., YOSHIMATSU, K., ARIKAWA, J. AND HASHIMOTO, N. (1992). Antibody-dependent enhancement of hantavirus infection in macrophage cell lines. Arch. Virol. **122**, 107-118.

YOSHIMATSU, K., YOO, Y.-C., YOSHIDA, R., ISHIHARA, C., AZUMA, I. AND ARIKAWA, J. (1993). Protective immunity of Hantaan virus nucleocapsid and envelope protein studied using baculovirus-expressed proteins. Arch. Virol. **130**, 365-376.

YOSHIMATSU, K., ARIKAWA, J., TAMURA, M., YOSHIDA, R., LUNDKVIST, Å., NIKLASSON, B., KARIWA, H. AND AZUMA, I. (1996). Characterization of the nucleocapsid protein of Hantaan virus strain 76-118 using monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. **77**, 695-704.

ZÖLLER, L., YANG, S., GÖTT, P., BAUTZ, E.K.F. AND DARAI, G. (1993). Use of recombinant nucleocapsid proteins of the Hantaan and nephropathia epidemica serotypes of hantaviruses as immunodiagnostic agents. J. Med. Virol. **39**, 200-207.

ZÖLLER, L., FAULDE, M., MEISEL, H., RUH, B., KIMMIG, P., SCHELLING, U., ZEIER, M., KULZER, P., BECKER, C., ROGGENDORF, M., BAUTZ, E.K.F., KRÜGER, D.H. AND DARAI, G. (1995). Seroprevalence of hantavirus antibodies in Germany as determined by a new recombinant enzyme immunoassay. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **14**, 305-313.

12. DANKSAGUNG

Ohne die uneigennützige Hilfe vieler Kolleginnen und Kollegen im In- und Ausland hätte diese Habilitation nicht entstehen können. An erster Stelle möchte ich mich bei Siegfried Scherneck, Rudolf Hagemann, Sinaida und Hans A. Rosenthal, Helga Siakkou, Paul Pumpens und Detlev H. Krüger bedanken, die mich maßgeblich in meiner Entwicklung beeinflusst und gefördert haben. Gholamreza Darai und Eckehard K.F. Bautz bin ich sehr dankbar, dass sie mich auf das Gebiet der Hantavirusforschung aufmerksam gemacht haben und die ersten Untersuchungen kritisch begleitet haben. Ohne die vielfältige Unterstützung der experimentellen Arbeiten in meinem Labor und der Kooperationsbeziehungen mit den Gruppen in Riga und Vilnius durch die Forschungskommission der Charité wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ganz herzlich gedankt sei meinen langjährigen Kooperationspartnern Helga Meisel, Åke Lundkvist, Kestutis Sasnauskas, Alma Gedvilaite, Ausra Dargeviciute, Hans R. Gelderblom, Muhsin Özel, Cornelius Frömmel, Burkhard Jandrig, Wolfgang Arnold, Galina Borisova, Tatyana Voronkova, Dace Skrastina, Andris Kazaks, Velta Ose, Ivars Petrovskis und Andris Dislers für den intensiven wissenschaftlichen Gedankenaustausch, die Mitteilung noch unveröffentlichter Daten und eine äußerst fruchtbare Zusammenarbeit, die ich auch in Zukunft sehr gern fortsetzen möchte.

Diese Arbeit wurde durch die vielfältige Unterstützung durch Kolleginnen und Kollegen am Institut für Virologie erst ermöglicht. Ich möchte den in meinem Labor tätigen DiplomandInnen und DoktorandInnen danken, deren großartige Arbeiten maßgeblichen Anteil an dieser Habilitation haben. Insbesondere danke ich Diana Koletzki, Sylvie Lachmann, Astrid Geldmacher, Andreas Zankl, Felix Cifire, Hassen Siray und Shamil Musema. Nicht weniger dankbar bin ich für die tatkräftige und exzellente Unterstützung durch Karin Dauer, Beate Ziaja, Anna Hegele, Christina Priemer, Brita Auste, Inge Krahn, Elsa Nugel, Claudia Muselmann, Ina Woskobojnik und Anne Wolbert. Beim Schreiben der Veröffentlichungen haben mir auch viele geholfen, denen hier gedankt sei, insbesondere Christina Grübel, Regina Tillner, Tobias Schröter und Dirk Büchel. Äußerst hilfreich waren für mich wissenschaftliche Diskussionen mit verschiedenen Freunden und KollegInnen; stellvertretend seien hier genannt Michael Nassal, Christian Pitra, Boris Klempa, Claus Sibold, Kathrin Leitmeyer, Harald Heider, Annette Kraus, Stefanie Sandmann, Thomas Hübschmann und Helge Taubert. Viele

Kolleginnen und Kollegen haben diese Arbeiten durch die großzügige Weitergabe von Materialien unterstützt; stellvertretend seien genannt Wolfram H. Gerlich, K.-H. Heermann, Peter Gött, Lothar Zöller, Morten Schütt, Maximilian Rasche, Judith Koch, Matthias Niedrig, Georg Pauli und Heinz Feldmann. Herzlich gedankt sei Detlev H. Krüger, Günther Schönrich und Astrid Geldmacher für das kritische Lesen dieser Arbeit und hilfreiche Hinweise sowie Christina Grübel und Karin Dauer für die Hilfe bei der Endredaktion der Arbeit.

Nicht zuletzt durch das Verständnis und die Unterstützung meiner Eltern und meiner Kinder konnte ich die hier vorgestellten Arbeiten durchführen.

13. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG GEMÄSS HABILITATIONSORDNUNG DER CHARITÉ

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum Unterschrift