

Projektbericht

In vitro-Methode zur Beurteilung der Impfstoffsicherheit in der Frühschwangerschaft

Prof. Dr. med. U. G. Liebert Institut für Virologie, Universität Leipzig, Johannisallee 30,
04103 Leipzig
Dr. rer. nat. Claudia Claus (+49) 341 9714300 (Tel.), (+49) 341 9714309 (Fax),
04103

Förderungszeitraum: April 2014 bis April 2015

Zusammenfassung

Für die Prävention von Viruserkrankungen über Impfstoffe besitzen attenuierte Lebendimpfstoffe aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit nach wie vor eine große Bedeutung. Trotz der Attenuierung besteht allerdings die potentielle Gefahr der Ausbreitung des abgeschwächten viralen Erregers und somit einer Krankheitsauslösung, besonders bei Immunsuppression und in der Schwangerschaft. Ziel dieses Projektantrages war es, ein geeignetes in vitro Zellkultursystem zu etablieren und zu charakterisieren, das zur Beurteilung der Impfstoffsicherheit in der Frühschwangerschaft beitragen kann. Ein solches System stellen humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPS Zellen) dar, die ebenso wie die humanen pluripotenten embryonalen Stammzellen (hES Zellen) als Modell für die frühen Schritte der menschlichen Embryonalentwicklung anzusehen sind. Im Gegensatz zu den hES Zellen sind die hiPS Zellen allerdings ethisch nicht fragwürdig. In dem vorliegenden Projekt wurde der Infektionsverlauf von Masernvirus, Rötelnvirus und Cytomegalievirus in hiPS Zellen charakterisiert. Während für das Cytomegalievirus bereits erste, allerdings teilweise konträre Publikationsdaten für den Infektionsverlauf in pluripotenten Stammzellen vorliegen, gelang mit dem vorliegenden Projekt die Erstcharakterisierung für Masern- und Rötelnvirus. Die gewonnenen Daten über den Infektionsverlauf zeigen, dass hiPS Zellen einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Charakterisierung des Infektionsverlaufes und somit der Impfstoffsicherheit in der Frühschwangerschaft darstellen. In weiterführenden Versuchen soll neben der bereits erfolgten Untersuchung der Auswirkung dieser Viren auf den Pluripotenzstatus auch die

Auswirkung auf die Differenzierbarkeit der infizierten hiPS Zellen erfolgen. Durch die finanzielle Förderung des vorliegenden Projektes durch die Roland Ernst Stiftung konnten die Grundlagen für zwei Publikationen und für weiterführende Untersuchungen gelegt werden.

Hintergrund

Die Frage der Impfstoffsicherheit stellt sich vor allem in der Schwangerschaft, da hier eine Beeinträchtigung des Immunsystems vorliegen kann. Weiterhin liegt eine erhöhte Vulnerabilität des embryonalen und fetalen Gewebes vor. Von den verwendeten Impfstoffen betrifft dies insbesondere attenuierte Lebendimpfstoffe (u. a. die Impfstoffe gegen Gelbfieber, Masern, Mumps, Röteln, Windpocken und Rotavirus-Gastroenteritis). Daher sind alle Lebendimpfstoffe in der Schwangerschaft und drei Monate vor Schwangerschaftsbeginn kontraindiziert. Ziel dieses Antrages war es, ein experimentelles (in vitro) Zellkultursystem zu etablieren, um die Sicherheit von abgeschwächten Lebendimpfstoffen in der Frühschwangerschaft zu beurteilen. Besonders die frühen Abschnitte der embryonalen menschlichen Entwicklung sind für Untersuchungen normalerweise nicht zugänglich. Diese Schwierigkeit kann mit embryonalen pluripotenten Stammzellen umgangen werden, die aus der inneren Zellmasse von Präimplantations-Blastozysten entstammen. Hingegen ist die Gewinnung von induzierten pluripotenten Stammzellen aus humanen Körperzellen über das Einbringen bestimmter Transkriptionsfaktoren (1) ethisch unproblematisch und birgt viel Hoffnung in ihrer klinischen Anwendbarkeit (2). Beide Typen von pluripotenten Stammzellen werden als Modell der frühen Schritte der menschlichen Embryonalentwicklung herangezogen (2). Pluripotenz umfasst die Fähigkeit einer Stammzelle, sich in alle spezialisierten Körperzellen zu entwickeln.

Während pluripotente Stammzellen bereits zur Beurteilung embryotoxischer Substanzen genutzt werden, steht ihre Anwendung zur Beurteilung der Impfstoffsicherheit oder umgekehrt des Gefährdungspotentials eines Pathogens in der Frühschwangerschaft noch aus. Generell ist sehr wenig bekannt, für welche Viren pluripotente Stammzellen überhaupt permissiv sind und wie sich der virale Infektionsverlauf gestaltet. Für das Coxsackievirus wurde beschrieben, dass es pluripotente Stammzellen unter Apoptoseinduktion infiziert (3). Als weiterer Virusvertreter wurde das Cytomegalievirus beschrieben. Während eine Publikation allerdings die Handhabbarkeit des Stammzellmodells für die Reaktivierung des latenten Cytomegalievirus

veranschaulicht (4), beschreiben zwei andere Publikation, dass in pluripotenten Stammzellen eine Einschränkung der Infektion und der Replikation des Cytomegalievirus vorliegt (5), (6). Eine sehr frühe Publikation legt sogar dar, dass die Vermehrung des Cytomegalievirus eng mit dem Prozess der Differenzierung assoziiert ist (7).

Projektziel

Im Rahmen dieses Antrages sollte anhand von hiPS Zellen ein geeignetes experimentelles Zellkulturmodell der frühen menschlichen Embryonalentwicklung zur Charakterisierung von Lebendimpfstoffen etabliert werden. Die Untersuchungen sollten sowohl mit bekannten fruchtschädigenden Viren (Röteln- und Cytomegalievirus) als auch mit Masernvirus durchgeführt werden. Zusätzlich zu sog. Wildvirusstämmen werden die Impfvirusstämme gegen Röteln und Masern in die Untersuchung mit eingeschlossen. Für das Masern- und Rötelnvirus liegen attenuierte Impfstoffe vor, deren Wirkung somit direkt mit den Wildvirusstämmen verglichen werden kann. Der attenuierte Lebendimpfstoff gegen das Rötelnvirus verursacht im Gegensatz zum nativen Wildtypvirus keine teratogenen Schädigungen (8), (9). Das humane Cytomegalievirus ist der häufigste virale Erreger kongenitaler Infektionen, allerdings ist bis dato kein Impfstoff verfügbar (10). Ein wesentlicher Punkt des vorliegenden Projektes war die Charakterisierung des Infektionsverlaufes dieser ausgewählten Virusvertreter auf hiPS Zellen. Der Schwerpunkt wurde hierbei auf die Auswirkung der Infektion auf die Pluripotenz der hiPS Zellen und auf das zytotoxische Potential der Virusvertreter gesetzt.

Projektumsetzung

Die erfolgreiche Etablierung einer Stammzellkultur in dem hiesigen virologischen Labor war der wesentliche Baustein für die Projektrealisierung. Für diese Etablierung wurden zwei verschiedene Stammzelllinien verwendet, die IMR90 (WiCell) und die Gibco® Human Episomal iPSC Line (ThermoFisher). Obwohl iPSC Zelllinien in ihren generellen Eigenschaften übereinstimmen, gibt es Unterschiede, die einerseits durch ihren Generierungsprozess (über Plasmid- oder virale Transduktion-basierte Reprogrammierung) und andererseits durch den parental Zelltyp bestimmt werden. Beide Zelllinien waren vergleichbar in der Expression von Pluripotenzmarkern, in ihrer Permissivität gegenüber den untersuchten Viren und im anschließenden Infektionsverlauf. Untersucht wurden für das Rötelnvirus drei verschiedene Stämme, der Laborstamm F-Therien, der Impfstamm HPV77 und das klinische Isolat Würzburg-12 (Wb-12, RVi/Wuerzburg.DEU/47.11, Genotype 2B; Robert-Koch-Institut Berlin). Für das

Cytomegalievirus (AD169-GFP), (11) und das Masernvirus (MV323-GFP), (12) wurden zwei rekombinante Virusstämme verwendet, die in ihrem Genom das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimieren. Somit war ein direktes und schonendes Nachverfolgen des Infektionsverlaufes in lebenden hiPS Zellkulturen möglich. Wir konnten die Publikationen von Kawasaki *et al.* insofern bestätigen (5), (6), dass in pluripotenten Stammzellen keine produktive Infektion mit dem Cytomegalievirus vorliegt. So bald im Kultivierungsverlauf der hiPS Zelllinien eine beginnende, spontane Differenzierung erfolgt, kommt es allerdings zu einer rasch voranschreitenden und massiven Infektion dieser Bereiche (Abbildung 1). Da keine Infektion in hiPS Zellkolonien möglich war, wurde das Cytomegalievirus von weitergehenden Untersuchungen ausgeschlossen. Allerdings sind die gewonnenen Daten entwicklungsbiologisch relevant, da das Cytomegalievirus in den hiPS Zellen eine Infektion auf sehr niedrigem Niveau zu etablieren scheint, da sofort eine Infektion auftritt, wenn spontane Differenzierungsbereiche auftreten. Also könnte es auch während der Embryonalentwicklung in einigen Zellen „ruhen“, um dann zu einem späteren Zeitpunkt eine produktive Infektion zu etablieren.

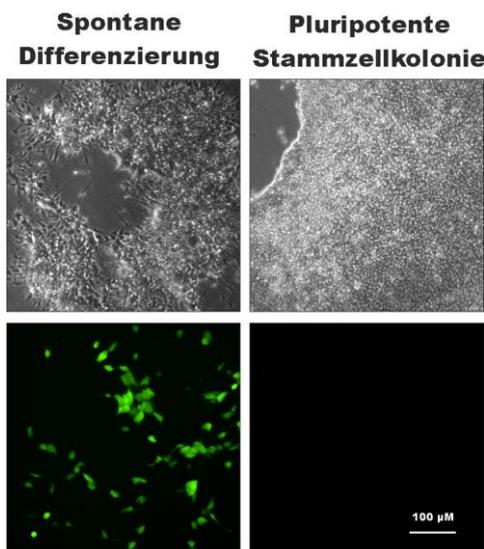


Abbildung 1. Darstellung des Cytomegalievirus in undifferenzierten und differenzierenden hiPS Zellkolonien anhand des rekombinant exprimierten GFP Proteins.

Für den Infektionsverlauf des Masernvirus und des Rötelnvirus konnte ein übereinstimmendes Muster nachgewiesen werden. Die Pluripotenzenmarker OCT4, SOX2, Nanog und SSEA4 wurden in den virusinfizierten hiPS Zellkulturen über entsprechende Antikörper in einer Immunfluoreszenz nachgewiesen. Es zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollpopulation. Ebenso wurden diese Marker auf mRNA Ebene über eine quantitative Echtzeit-PCR nachgewiesen (real-time quantitative PCR, RT-qPCR). Weiterhin konnten keine cytopathischen Effekte identifiziert werden. Für

dessen Nachweis wurde einerseits ein Assay für aktive Caspase 3/7 und für die Abgabe der Laktatdehydrogenase (LDH) in das umgebende Zellkulturmedium durchgeführt. LDH ist nur nach Schädigung der Plasmamembran extrazellulär nachweisbar. Somit konnten mit dem vorliegenden Antrag die Grundlagen für den Aufbau eines geeigneten in vitro Testsystems zur Beurteilung der möglichen Auswirkungen einer viralen Infektion in einem sehr frühen Stadium der Embryonalentwicklung gelegt werden. Ein entsprechendes Manuskript zur Darstellung der gewonnenen Daten zum viralen Infektionsverlauf in hiPS Zellen ist in Vorbereitung.

Ausblick

Weiterführende Untersuchungen werden Mikroarray-Analysen einschließen. Bisher deuteten sich in den RT-qPCR-Untersuchungen keine wesentlichen Änderungen in der Expression von zentralen Pluripotenzmarkern an. Später sollen Marker für entwicklungsbiologisch relevante Signalwege eingeschlossen werden. Neben dem Rötelnvirus, dem Masernvirus und dem Cytomegalievirus soll auch das Coxsackievirus hinzugezogen werden. Die bisher untersuchten Virusstämme besitzen kein direktes zytopathogenes Potential auf den untersuchten hiPS Stammzelllinien. Für Coxsackievirus hingegen wurde ein vergleichsweise rascher Anstieg an apoptotischen Zellen publiziert (3), dies soll für unsere beiden Zelllinien verifiziert und vergleichend hinzugezogen werden.

Anhand der pluripotenten Stammzellen lässt sich nicht nur das Blastozystenstadium analysieren, sondern nach Initiierung der Differenzierung (durch geeignete Kulturbedingungen und in Abwesenheit von Differenzierungsinhibitoren wie Interleukin 6) auch das Prägastrulationsstadium. Embryonale und induzierte pluripotente Stammzellen können sich in Derivate der drei Keimblätter (Mesoderm, Ektoderm, Entoderm) differenzieren. Durch ihre Aggregation bilden sich die sogenannten „Embryoid Bodies“ aus, die Embryo-ähnlichen Körperchen. Mit dem vorliegenden Antrag konnte die virale Beeinflussung undifferenzierter hiPS Zellen adressiert werden, daher soll in weiterführenden Untersuchungen zur Beeinflussung des differenzierenden und differenzierten Status übergegangen werden. Dieser Punkt, die Analyse der Differenzierungsfähigkeit, ist auch ein wesentlicher Bestandteil des EST (Embryonic Stem Cell Test).

Literaturliste

1. **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S.** 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**:861-872.
2. **Theunissen PT, Piersma AH.** 2012. Innovative approaches in the embryonic stem cell test (EST). *Front Biosci-Landmark* **17**:1965-1975.
3. **Romorini L, Scassa M, Richardson G, Blüguermann C, de Giusti C, Questa M, Fernandez Espinosa D, Gómez R, Sevlever G, Miriuka S.** Activation of apoptotic signalling events in human embryonic stem cells upon Cocksackievirus B3 infection. *Apoptosis*:1-11.
4. **Penkert RR, Kalejta RF.** 2013. Human embryonic stem cell lines model experimental human cytomegalovirus latency. *MBio* **4**:e00298-00213.
5. **Kawasaki H.** 2012. Pluripotent stem cells are protected from cytomegalovirus infection at multiple points: implications of a new pathogenesis for congenital anomaly caused by cytomegalovirus. *Congenit Anom (Kyoto)* **52**:147-154.
6. **Kawasaki H, Kosugi I, Arai Y, Iwashita T, Tsutsui Y.** 2011. Mouse embryonic stem cells inhibit murine cytomegalovirus infection through a multi-step process. *PLoS One* **6**:e17492.
7. **Gonczol E, Andrews PW, Plotkin SA.** 1984. Cytomegalovirus replicates in differentiated but not in undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Science* **224**:159-161.
8. 2011. Rubella vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* **86**:301-316.
9. **Hofmann J, Kortung M, Pustowoit B, Faber R, Piskazeck U, Liebert UG.** 2000. Persistent fetal rubella vaccine virus infection following inadvertent vaccination during early pregnancy. *Journal of medical virology* **61**:155-158.
10. **Dickinson JE.** 2013. Congenital viral infections: Available strategies to decrease their prevalence. *Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology* **53**:217-219.
11. **Marschall M, Freitag M, Weiler S, Sorg G, Stamminger T.** 2000. Recombinant green fluorescent protein-expressing human cytomegalovirus as a tool for screening antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1588-1597.
12. **Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y.** 2002. SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J Virol* **76**:6743-6749.