



Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie

Institut für Biologie

– Bachelorarbeit –

Untersuchungen zum Einfluss veränderter Aminosäuresequenzen im Haemagglutinin-
Neuraminidase-Protein aktueller Mumpswildviren im Vergleich zum Impfvirus

vorgelegt von

Caroline Busch

Matrikelnummer: 4449524

Berlin, August 2013

Angefertigt im Fachgebiet „Masern, Mumps, Röteln und Viren bei Abwehrschwäche“

Robert Koch-Institut

Erstgutachter: PD Dr. Annette Mankertz

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

ROBERT KOCH INSTITUT



Eidesstattliche Erklärung

Mit meiner Unterschrift versichere ich, dass die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter von mir verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Alle Stellen, die inhaltlich oder wörtlich aus Veröffentlichungen stammen, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit lag in gleicher oder ähnlicher Weise noch keiner Prüfungsbehörde vor und wurde bisher nicht veröffentlicht.

Berlin, den 19.08.2013

Caroline Busch

I.	INHALTSVERZEICHNIS	
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
III.	TABELLENVERZEICHNIS	VI
IV.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
V.	ABSTRACT	IX
1	EINLEITUNG	1
1.1	KRANKHEITSBILD	1
1.2	EPIDEMIOLOGIE	2
1.3	MUMPSVIRUS	4
1.3.1	TRANSKRIPTION UND REPLIKATION	5
1.3.2	DAS HN-PROTEIN	7
1.4	DIE IMMUNANTWORT	8
1.4.1	KLASSIFIKATION UND EIGENSCHAFTEN VON ANTIKÖRPER	8
1.4.2	BEDEUTUNG NEUTRALISIERENDER ANTIKÖRPER BEI DER MUV-IMMUNITÄT	10
1.4.2.1	NEUTRALISIERENDE EPITOPE DES HN-PROTEINS	10
1.5	ZIELSETZUNG	12
2	MATERIAL	14
2.1	CHEMIKALIEN	14
2.2	ENZYME	14
2.3	ANTIÖRPER	14
2.4	PLASMIDE	15
2.5	MEDIEN	15
2.5.1	MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN	15
2.6	VIREN UND ZELLINIEN	15
2.6.1	VIREN	15
2.6.2	EUKARYOTISCHE ZELLINIEN	15
2.7	PUFFER	16
2.7.1	ANGESETZTE PUFFER	16
2.8	KITS	16
2.9	VERBRAUCHSMATERIALIEN	17
2.10	GERÄTE	17
2.11	SOFTWARE UND WEBSEITEN	18
3	METHODEN	18
3.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	18
3.1.1	KULTIVIERUNG VON ZELLINIEN	18
3.1.2	TRANSFEKTION VON EUKARYOTISCHEN ZELLINIEN	18
3.1.2.1	CALCIUMPHOSPHAT-TRANSFEKTION	19
3.1.2.2	X-TREMEGENE-TRANSFEKTION	19
3.1.3	INFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN	20
3.2	ANALYSE VON PROTEINEN	21
3.2.1	IMMUNFLUORESCENZ ASSAY (IFA)	21
4	ERGEBNISSE	24
4.1	HERSTELLUNG UND EXPRESSION VON HN-PROTEINEN MIT AS-AUSTAUSCHEN IN AK EPITOPEN (ERGEBNISSE DER LABORARBEIT)	24
4.2	ETABLIERUNG DER VERSUCHSBEDINGUNGEN ZUR UNTERSUCHUNG DER NEUTRALISIERENDEN KAPAZITÄT VON PATIENTENSEREN IN DER IMMUNFLUORESCENZ	30
4.3	NACHWEIS VON HN-PROTEINEN MITTELS MONOKLONALER MUV-AK IN DER IMMUNFLUORESCENZ-ANALYSE	39
4.3.1	HN-NACHWEIS IN TRANSFIZIERTEN ZELLEN	39

4.3.2	NACHWEIS DES HN-PROTEINS IN INFIZIERTEN VERO ZELLEN	42
4.4	NACHWEIS DES HN-PROTEINS IN INFIZIERTEN ZELLEN MIT HILFE VON PATIENTENSEREN.....	47
5	DISKUSSION.....	49
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	55
VI.	LITERATURVERZEICHNIS.....	XI
VII.	DANKSAGUNG	XVI

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung von MuV-Genotypen 2005-2011 [21].....	3
Abbildung 2: Aufbau des Mumpsvirus.....	5
Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Antikörpers am Beispiel IgG.....	10
Abbildung 4: Formel zur Berechnung der Virussuspension.....	21
Abbildung 5: AS-Sequenz-Vergleich des HN-Proteins von Wildtypstämmen und Impfstämmen. ...	26
Abbildung 6: AS-Sequenz des HN-Proteins des Impfstammes JL.	26
Abbildung 7: Kontrollen zur Transfektion der HEK293G Zellen.....	28
Abbildung 8: Nachweis der Expression der HN-Mutanten in transfizierten HEK293G Zellen.	28
Abbildung 9: Besonderheiten bei der Proteinexpression der Mutanten Mut3 und Mut4 in transfizierten HEK293G Zellen.	30
Abbildung 10: IFA mit Patientenserum bei transfizierten HEK293G Zellen.....	31
Abbildung 11: Titrierung des Sekundär-AK anti Mensch Immunglobulin aus der Ziege.	33
Abbildung 12: Immunfluoreszenz von Cos7 und Vero Zellen.....	36
Abbildung 13: Immunfluoreszenz nach Vorinkubation mit IgG-negativem Patientenserum.	37
Abbildung 14: Nachweis des HN _{JL} -Proteins in der Immunfluoreszenzanalyse mittels monoklonaler Antikörper.....	41
Abbildung 15: Kontrolle der Infektion von Vero Zellen mit dem MuV Jeryl Lynn (JL).....	43
Abbildung 16: Nachweis des HN-Proteins in infizierten Vero Zellen mit Hilfe der monoklonalen AK von C. Örvell.....	43
Abbildung 17: Nachweis des N- und HN-Proteins in infizierten Vero Zellen.....	46
Abbildung 18: Immunfluoreszenz von infizierten Vero Zellen mit Patientenseren.	48

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionsansätze pro Loch (24-Loch-Platte) bei einer Calciumphosphat-Transfektion	19
Tabelle 2: Reaktionsansätze pro Loch (24-Loch-Platte) bei einer X-tremeGENE-Transfektion	20
Tabelle 3: Primäre Antikörper-Ansätze im Immunfluoreszenz Assay.....	22
Tabelle 4: Sekundäre Antikörper-Ansätze im Immunfluoreszenz Assay	23
Tabelle 5: Bezeichnung und Lokalisation der HN-JL Mutationen.	26

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
AK	Antikörper
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
β	Beta
bp	<i>base pair</i> , Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
kLSM	<i>confocal Laser Scanning Microscopy</i> , konfokale Laser-Raster-Mikroskopie
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPE	<i>cytopathic effect</i> , zytopathischer Effekt
DG	Deckglas
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
F	Fusion
Fab	<i>fragment antigen binding</i> , antigenbindende Fragment
Fc	<i>fragment crystallizable</i> , kristallisierbares Fragment
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde
HCL	Chlorwasserstoff
HEK Zellen	<i>Human Embryonic Kidney cells</i> , menschliche embryonale Nierenzellen
HN	Haemagglutinin-Neuraminidase
Ig	Immunglobulin
IU	<i>international unit</i>
JL	Jeryl-Lynn
kb	Kilobasen
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
L	Large
M	Matrix
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMR	Masern, Mumps, Röteln
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MTOC	<i>microtubule organizing center</i> , Mikrotubuli organisierende Zentrum
MuV	Mumpsvirus
N	Nukleokapsid
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NT	Neutralisationstest
Ori	<i>Origin of replication</i> , Replikationsursprung
P	Phosphor
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i> , Pathogen assoziierte molekulare Muster
Pat.serum	Patientenserum
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PenStrep	Penicillin Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Pro	Prolin
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> , Mustererkennungsrezeptoren
rER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
STIKO	Ständige Impfkommision
T _a	Annealing-Temperatur
T _m	Schmelztemperatur
u	<i>unit</i> - atomare Masseneinheit
U	Einheit zur Angabe der Enzymaktivität
u. a.	unter anderem
v.a.	vor allem
WHO	<i>World Health Organisation</i> - Weltgesundheitsorganisation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

V. Abstract

The Mumps virus belongs to the family of paramyxoviridae and is a single-stranded, negative-sensed RNA virus. The genome encodes for nine proteins. The focus of this study was on the hemagglutinin-neuraminidase protein (HN-protein) which is essential in virus neutralizing. In the last years increasing reports of mumps outbreaks in vaccinated or naturally infected populations were documented. Most outbreaks belonged to the genotype G whereas genotype A is mostly used for vaccination. Some results of former studies suggested that antibodies formed by vaccine strains neutralize wild-type viruses less effectively, leading to discussions concerning the development of a new mumps vaccine. Recent studies of the “Robert Koch-Institute” showed that a third dose of mumps-containing vaccine does not increase protection and also waning immunity was ruled out as a factor of reinfection.

The aim of this study was to investigate the impact of natural occurring mutations in the HN-protein on the binding capacity of sera from vaccinated or naturally infected individuals. For this purpose, six constructs of mutated HN have been generated before. These constructs are based on amino acid alterations in regions already known or suspected to be relevant for neutralization. As the binding capacity of human antibodies to HN was supposed to be tested in an Immunofluorescence Assay (IFA), first of all staining conditions with human sera had to be established. Solitary expressed HN could neither be detected with human sera using various conditions nor with mouse monoclonal antibodies (kindly provided by C. Örvell) which were used as a control. To determine whether the detection of HN by IFA requires viral context, MuV infected Vero cells were stained with human sera or the monoclonal antibodies. Five monoclonal antibodies were able to detect HN in infected cells while the human sera still failed to detect the HN-protein. That was a surprising result because IFA is a method often used in diagnostic surveys and serum titer could be determined by ELISA, a method based on a similar principle as IFA. Another research group, which used the same plasmid construct encountered the same problem. It might be possible that transfected HN is not correctly folded or modified (e.g. not properly glycosylated) due to the N-terminal myc-epitope of the used plasmid.

Although the impact of natural occurring mutations could not be determined in this study, the results can be used for serological diagnostics and studies using plasmid constructs with myc-epitopes.

1 Einleitung

1.1 Krankheitsbild

Mumps, auch Ziegenpeter genannt, ist eine im Kindes- und Jugendalter auftretende, ansteckende Viruserkrankung, primär charakterisiert durch Entzündungen einer oder beider Ohrspeicheldrüsen (*Parotitis*). Bei einer fehlenden Immunisierung werden jährlich ca. 100-1.000 Mumps-Fälle pro 100.000 Einwohner erfasst. Alle zwei bis fünf Jahre kommt es zu epidemischen Höhepunkten, die in heißen Klimazonen zu jeder Jahreszeit auftreten können. Gemäßigte Klimazonen zeigen hingegen eine erhöhte Auftrittswahrscheinlichkeit im Winter und Frühjahr [2].

Der einzige Wirt des Mumpsvirus (MuV) ist der Mensch, der sich über direkten Kontakt oder Tröpfcheninfektionen infizieren kann. Die Inkubationszeit beträgt im Durchschnitt 15 bis 25 Tage [3] und beginnt mit unspezifischen Symptomen, wie Kopf- und Gliederschmerzen, Unwohlsein oder leicht erhöhter Körpertemperatur. Über ein Drittel aller Infektionen verlaufen jedoch asymptomatisch [4]. Nach einer Infektion der Schleimhäute des Nasal-, Hals- oder Rachenraums [5] vermehrt sich das MuV in den glandulären Epithelien. Lokale Lymphozyten werden vom MuV befallen und verteilen das Virus in umliegende Lymphknoten und die Blutbahn. Das häufigste Symptom bei einer MuV Erkrankung ist eine schmerzhafteste Parotitis, bei der Schwellungen der Ohrspeicheldrüsen bis zu einer Woche anhalten können. Komplikationen (1/10.000 Fälle) wie Ertaubung, *Meningitis* (Entzündung der Hirnhäute), *Enzephalitis* (Entzündung des Gehirns), *Orchitis* (Entzündung der Hoden) oder *Oophoritis* (Entzündung der Eierstöcke) sind meist im erwachsenen Alter zu finden [2]. *Orchitis* (15-30 % aller Fälle) tritt fast ausschließlich nach der Pubertät auf und beeinflusst nur selten die Fertilität [4,6-8]. Insgesamt treten Komplikationen bei Frauen im Vergleich zu Männern seltener auf [9,10]. Bei Frauen kann eine Infektion in den ersten 12 Schwangerschaftswochen zu einem spontanen Schwangerschaftsabbruch führen [11]. Fetale Missbildungen aufgrund einer Mumps Infektion wurden nicht nachgewiesen, sodass von keiner fruchtschädigenden Wirkung ausgegangen wird. Weitere vereinzelt auftretende Komplikationen können das Zentrale Nervensystem (ZNS) betreffen. Bei 50-60 % der Mumps Patienten wird eine asymptomatische *Pleozytose* (erhöhte Zellzahl; > 5 Leukozyten/mm³) im *Liquor cerebrospinalis* diagnostiziert [2]. Im Gegensatz dazu wird *Symptomatische Meningitis* in 15 % und *Enzephalitis* in 0,02-0,3 % aller MuV Fälle diagnostiziert. Eine Behandlung von Mumps erkrankten Patienten erfolgt nur symptomatisch (schmerzstillend, fiebersenkend), da keine antivirale Therapie zur Verfügung steht [9]. Eine Schutzimpfung gegen Mumps ist die einzige Möglichkeit der Primärprävention. Dafür stehen Kombinationsimpfstoffe gegen

Masern, Mumps und Röteln (MMR) zur Verfügung. Die ständige Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut (RKI) empfiehlt die erste Impfung mit dem MMR Kombinationsimpfstoff ab dem 12. Lebensmonat und einen Monat danach die zweite Impfung [12,13]. Die Impfung wird im Allgemeinen gut vertragen. Eine adverse Reaktion auf die Impfung ist selten und in den meisten Fällen milde verlaufend. Die Impfung von Schwangeren bzw. Menschen mit einer Immundefizienz oder einer schweren Immunsuppression ist kontraindiziert [2].

1.2 Epidemiologie

Mumps gehört zu den impfpräventablen Krankheiten. Die erste Virus Vakzine (ein Totimpfstoff) wurde 1948 in den Vereinigten Staaten von Amerika lizenziert und im Zeitraum von 1950-1978 verwendet. Die Gewährleistung eines langen Schutzes und lebenslanger Immunität blieb jedoch aus, sodass in den darauf folgenden Jahren verschiedene attenuierte Lebendimpfstoffe entwickelt wurden [2]. Heute gibt es 11 verschiedene Impfstämme zur Herstellung von Vakzinen, meist in einer trivalenten Kombination mit Impfstoffen gegen Masern und Röteln (MMR) [9]. Die Jeryl-Lynn (JL) Vakzine wird seit dem Jahr 1977 für mehr als 30 Jahre als Routineimpfung in den Vereinigten Staaten von Amerika verwendet. Bei fast allen verwendeten Impfstämmen zeigten Serokonversionsraten (Entwicklung spezifischer Antikörper gegen Antigene) von 80-100 %, dass bereits nach einer Impfdosis eine aktive Immunantwort ausgebildet wird [2]. Die WHO empfiehlt für einen möglichst lebenslanganhaltenden Schutz die Gabe von zwei Impfdosen. Schweden war 1982 das erste Land der Welt, das das Zwei-Dosen-Impfprogramm einführte [14]. Im Dezember 2005 wurden in mehr als 80 % der 110 WHO Impfländer eine zweite Impfdosis eingeführt.

Trotz der Impfeempfehlungen der WHO kam es in den letzten Jahren verstärkt zu Ausbrüchen in der geimpften Bevölkerung. Entgegen einer hohen Impfdichte traten auch in europäischen Ländern und in Nord-Amerika immer wieder MuV-Epidemien auf [15,16]. Die betroffene Zielgruppe war dabei nicht wie in früheren Jahren beobachtet Kleinkinder, sondern Jugendliche im Alter zwischen 15 und 19 Jahren [17]. Ursache für diese Epidemien waren entweder die unterbliebende Impfung im Kindesalter oder ein scheinbar nicht anhaltender Impfschutz [18]. Weitere Ursachen für ein Versagen der Mumps-Impfung können vielfältig sein, ungeeignete Lagerung des Impfstoffes, primäres Impfversagen (keine Serokonversion, geringe AK-Entwicklung), sekundäres Impfversagen (abnehmende Immunität mit zunehmendem Zeitabstand zur Impfung) oder Reinfektion mit heterologen oder sich-verändernden MuV-Stämmen (klassischer Impfdurchbruch) [9,19].

Mumpsviren sind serologisch monotypisch. Die Genotypisierung von Mumpsviren erfolgt über eine phylogenetische Analyse der Sequenz des SH-Gens. Bis heute sind 12 Genotypen mit den Bezeichnungen „A“ bis „N“ (ausgenommen E und M) beschrieben [20,21]. Zur

Beschreibung eines neuen Genotyps wurde eine Variation des SH-Gens von mindestens 6 % [22], sowie Kriterien zur Vermeidung einer Doppelbeschreibung durch unterschiedliche Wissenschaftler [20] und Erstellung einer Standardnomenklatur (Länder Code, Jahr, Stamm, Genotyp) festgelegt [23]. Daten basierend auf dem HN-Gen bestätigten die Einordnung in Genotypen mittels SH-Gen [24] und werden in Genotypisierungsbefunde miteinbezogen [21]. Einzelne Genotypen wurden jedoch nicht mit einer unterschiedlich starken Ausprägungen der MuV Erkrankung in Verbindung gesetzt. Die globale Verteilung von MuV Genotypen ist lediglich in 34 von 194 Ländern bekannt (Abbildung 1). Diese Informationen lassen vermuten, dass die Genotypen C, D, G, H, J und K in der westlichen Hemisphäre auftreten und die Genotypen B, F, G, I und L häufig in Asien zu finden sind [21]. Kriterien nach denen sich die einzelnen Stämme bzw. Genotypen in der Welt verteilen, sind bis lang nicht bekannt, jedoch wird davon ausgegangen, dass die Verwendung unterschiedlicher Impfstämme hierbei eine Rolle spielen könnte [25].

Die WHO hat es sich als Ziel gesetzt die Elimination der Masern-, Mumps -und Rötelnviren in Europa bis 2015 zu bewältigen. Da auch der Mumps-Impfstoff Bestandteil der verimpften Triplevazine ist, kann Mumps ebenfalls ausgerottet werden [13]. Dies ist möglich, da das MuV aus serologischer Sicht monotypisch ist und der Mensch das einzige Virusreservoir darstellt [21]. Durch eine Erhöhung der Impfraten (> 95 %) kann eine Übertragung des Virus vollkommen unterbrochen werden [12].

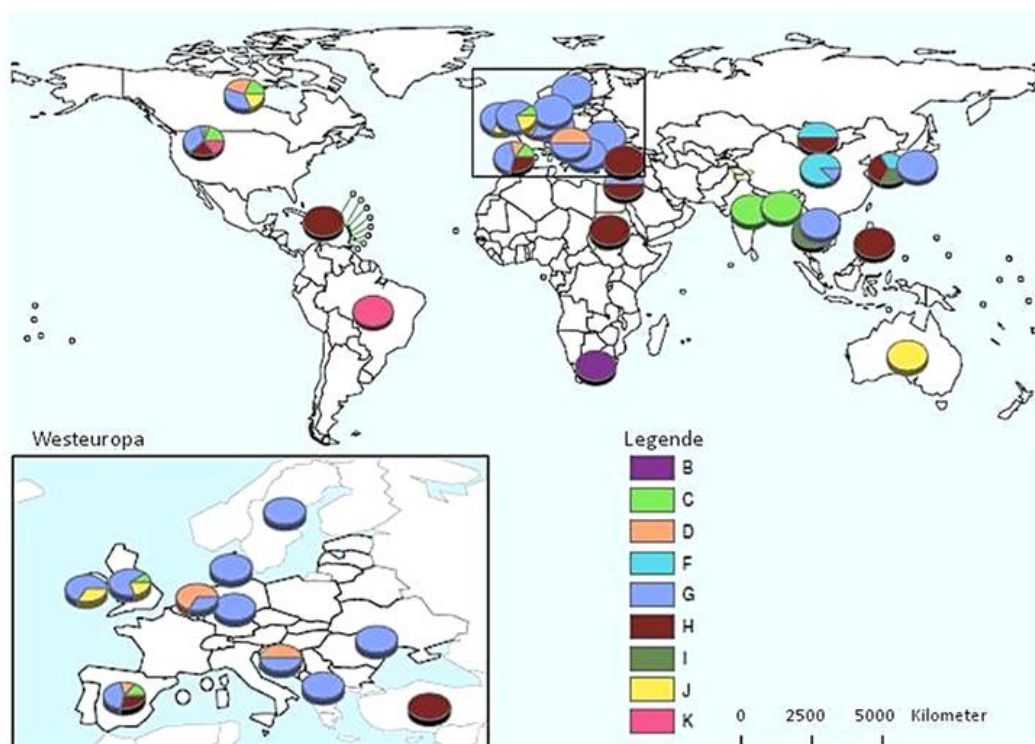


Abbildung 1: Verteilung von MuV-Genotypen 2005-2011 [21].

Auf der Weltkarte sind farblich gekennzeichnet die verschiedenen Genotypen (B-K)

1.3 Mumpsvirus

Das Mumpsvirus gehört dem Genus der Rubulaviren und der Familie der *Paramyxoviridea* an [26]. Die pleiomorphen, teils sphärischen Viruspartikel haben einen Durchmesser von ca. 200 nm [9]. Das Genom des Virus (Abbildung 2 A) besteht aus einer einzelsträngigen, nicht-segmentierten, negativ-orientierten RNA, die 15.384 Nukleotide umfasst [27]. Diese Nukleotide kodieren für insgesamt neun Proteine aus sieben Transkriptionseinheiten, die in folgender Reihenfolge auf dem Genom vorliegen: 3'-N-V/P/I-M-F-SH-HN-L-5' [28,29]. Zwischen den einzelnen Genen befinden sich intergenische Nukleotide (nicht transkribierte Sequenzen), deren Längen zwischen ein bis sieben Basen schwanken [29,30]. An den Start-(S) und Endpunkten (E) der Gene befinden sich konservierte Sequenzfolgen, die für eine geordnete Transkription der Genomabschnitte sorgen [30]. Das 3' und 5' Ende des Genoms bilden nicht kodierende Sequenzen, die auch als *Trailer* und *Leader* bezeichnet werden. Am 55-Nukleotid langen 5' Ende liegen cis-aktive Initiationssignale, die regulatorische Funktionen bei der Virusreplikation und bei der Verpackung der Nukleokapside in Viruspartikel übernehmen [29-31].

Die RNA allein ist nicht infektiös. Um biologisch aktiv zu sein, muss die RNA von einem Nukleokapsid umhüllt sein. Das Nukleokapsid (Abbildung 2 B) setzt sich aus drei Hauptproteinen zusammen: Nukleokapsid-Protein (N-Protein), Phospho-Protein (P-Protein) und *Large*-Protein (L-Protein). Die letzten beiden bilden die aktive Polymerase für die Replikation und Transkription [30]. Umgeben wird das Nukleokapsid von einer Doppel-lipidschicht, an deren Innenseite das Matrix-Protein (M-Protein) angelagert ist. Eingelagert in die Membran sind zwei Oberflächenproteine: das Haemagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN-Protein) und das Fusions-Protein (F-Protein, 538 AS) [30,32]. Das M-Protein (375 AS) bewirkt den Zusammenbau und die Knospung des Virions [28,32]. Die Oberflächenproteine vermitteln die virale Adsorption, sowie die Fusion der Virionmembran mit der Wirtszellmembran [28]. Ein weiteres Protein ist das *Small-Hydrophobic*-Protein (SH-Protein), das aufgrund seiner hohen Variabilität zur Genotypisierung von Mumps-Stämmen verwendet wird. Das SH-Protein ist kein Bestandteil des Virions und zählt, wie die Proteine V und I, die durch RNA-Editing aus dem P-Gen entstehen, zu den akzessorischen Nicht-Strukturproteinen [33-35]. SH und V sind an der Umgehung der antiviralen Wirtsantwort beteiligt. Die Rolle des I-Proteins während der Virusreplikation ist noch nicht bekannt.

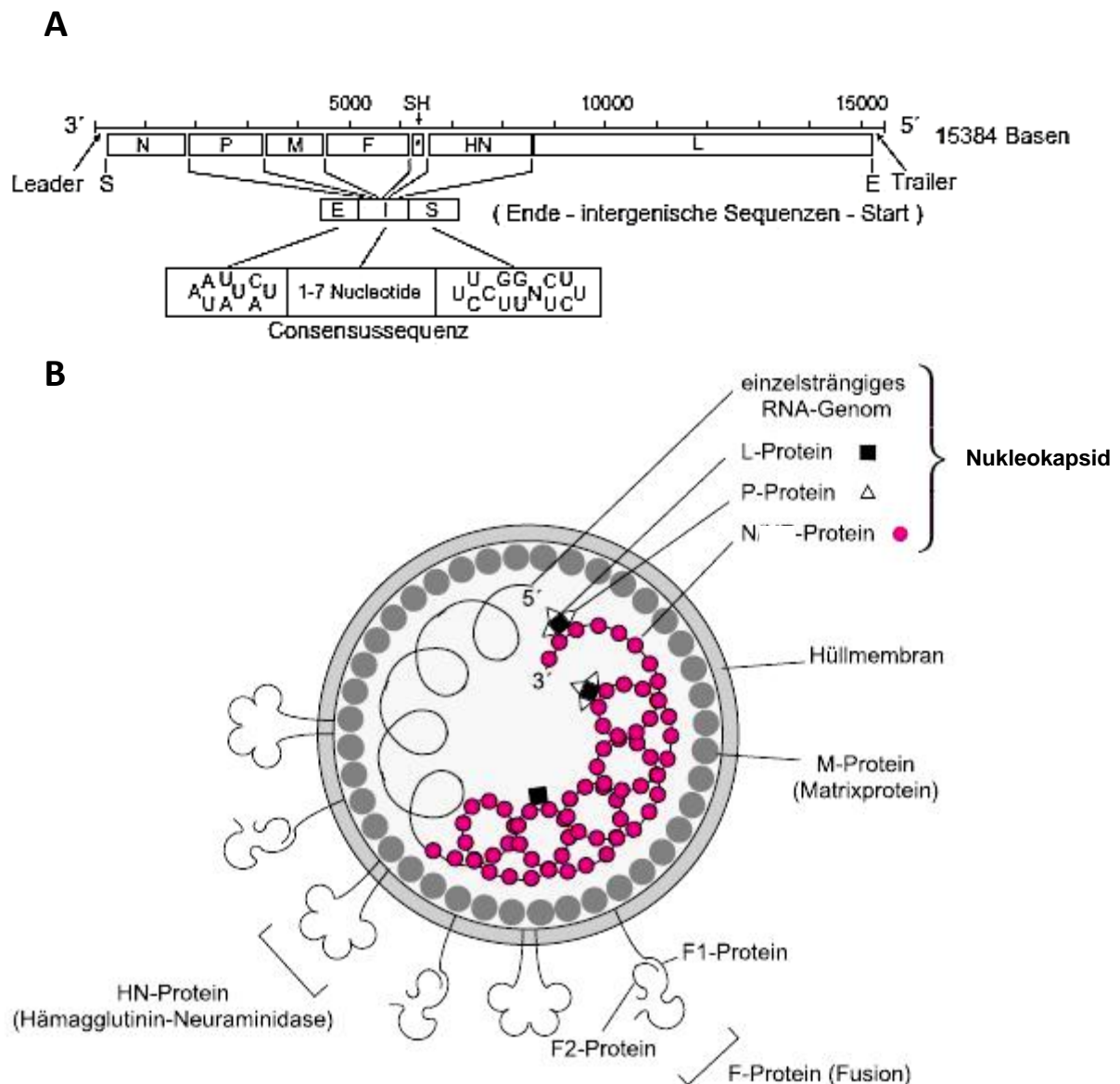


Abbildung 2: Aufbau des Mumpsvirus.

Schematische Darstellung des Genoms (A) und des Virions (B) [30]

1.3.1 Transkription und Replikation

Die Replikation der Paramyxoviren beginnt mit der Adsorption des HN-Proteins an die Wirtszelloberfläche. Dabei bindet das HN-Protein Sialylsäuren, die endständig an Oberflächenstrukturen von Zellen vorkommen und interagiert mit dem F-Protein. Dieses vermittelt daraufhin die Verschmelzung der Hüllmembran des Virions mit der Zytoplasmamembran des Wirtes und ermöglicht dadurch die gezielte Aufnahme des Nukleokapsids in die Zelle. Die Translation des RNA-Genoms in Proteine erfolgt über einen mRNA Zwischenschritt. Dafür ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase mit dem Nukleokapsid verbunden

und tritt mit diesem zusammen in die Zelle ein. Das L-Protein kodiert für die RNA-Polymerase und ist zusammen mit N und P für den Ablauf der Transkription essentiell [36]. Die Transkription beginnt an der 3' *Leader*-Sequenz und bricht kurz vor dem N-Gen ab, um anschließend erneut die Transkription am Startsignal des N-Gens zu beginnen. Gestoppt wird der Vorgang im Bereich der Konsensussequenz E, überspringt die intergenischen Basen und beginnt erneut an der Konsensussequenz S des benachbarten Gens. Beim Überspringen bleibt der Polymerase-Komplex mit dem Genom assoziiert. Dieser Ablauf wird durchgängig wiederholt bis sieben mRNA-Sequenzen vorliegen [30,37]. Zur Transport-Stabilisierung ist das 3' Ende gecappt. Das 5' Ende wird mit Hilfe des P-Proteins polyadenyliert. Die mRNA-Synthese ist jedoch nicht immer erfolgreich. Häufig treten Fehler beim Stoppen, Überspringen und Neustarten an den Konsensussequenzen auf. Die Folge daraus, ist ein Abfall des Enzymkomplexes und ein unterschiedliches Mengenverhältnis der mRNAs und der daraus folgenden Proteine. Entsprechend der Genreihenfolge ist die Konzentration des N-Proteins am höchsten und die des L-Proteins am geringsten [35]. Die Nicht-Strukturproteine V und I entstehen durch RNA-Editing aus dem P-Gen. RNA-Editing ist ein Vorgang, bei dem durch Einfügen von einem oder zwei Guanodin-Resten in einer Poly (U)-reichen Region das Leseraster verschoben wird [30]. Das V-Protein hat seine Funktion in der Blockierung des Interferon- und Interleukin-6-Signalweges und beeinflusst die Virulenz des MuV. Die Rolle des I-Proteins ist ungeklärt [38].

Um neue Virusgenome bilden zu können, muss es auch kontinuierlich gebildete RNA-Moleküle geben, die als Matrize für ein Gesamtmolekül dienen und bei denen die Synthese nicht an den Konsensussequenzen abbricht. Der Wechsel von der mRNA-Synthese zur Replikation mit durchgehenden RNA-Molekülen (Antigenom) hängt von der vorhandenen Menge an N-Proteinen ab. Durch Interaktionen mit der *Leader*-RNA gewährleisten N-Proteine das Überlesen der E-Konsensussequenzen und verhindern so den Replikationsabbruch (Antitermination). Die neu entstehenden Genome werden sofort mit N-Proteinen komplexiert, wobei je ein N-Protein sechs Nukleotide bindet. Für eine effiziente Replikation muss das Genom daher ein Vielfaches von sechs aufweisen („*rule of six*“) [37].

Die Oberflächenproteine F und HN werden im Golgi-Apparat modifiziert und dann zur Zelloberfläche transportiert. Das F-Protein wird durch eine Protease in die Untereinheiten F₁ und F₂ gespalten. Die M-Proteine lagern sich an die Innenseite der Zytoplasmamembran an und bilden eine Matrixproteinschicht aus. Durch Interaktion der M-Proteine mit den zytoplasmatischen Anteilen der Oberflächenproteine, sowie mit dem Ribonukleoproteinkomplex des RNA Genoms stülpt sich die Membran aus und neue Viruspartikel werden freigesetzt (*Budding*).

1.3.2 Das HN-Protein

Die mRNA des HN-Proteins besteht aus 1.887 Nukleotiden und kodiert für 582 AS, die eine molekulare Masse von 64 kDa ausmachen. Sie enthält einen langen offenen Leserahmen mit einer untranslatierten Region von 78 Nukleotiden am 5' Ende und einer untranslatierten Region von 60 Nukleotiden am 3' Ende [39].

Das HN-Protein besitzt eine ungespaltene NH₂-terminale Signal-/Verankerungsdomäne und eine COOH-terminale Ektodomaine und gehört daher zu den Typ II Proteinen [40]. Beim Transport des Glykoproteins zur Zelloberfläche wird ein intrazellulärer Pfad durchlaufen. Zuerst wird das HN-Protein mit Hilfe seiner hydrophoben Verankerungsdomäne am N-Terminus (AS 18-36) in das Endoplasmatische Retikulum (rER) eingebracht, in dessen Lumen Glykosylierungen stattfinden [40]. Anschließend wird vor Erreichen der Plasmamembran der Golgi-Apparat passiert. Während des Transports wird das Protein weiter post-translational modifiziert und gefaltet [41]. Einmal an der Zelloberfläche exprimiert, wird HN entweder in neu entstehende Viren eingebaut oder in endosomale Vesikel und Lysosomen aufgenommen und wieder abgebaut [8].

Die vorherrschende Sekundärstruktur von HN ist ein β -Faltblatt und die Faltung des Proteins ist ein β -Propeller. Es wurden neun potentielle N-Glykosylierungsstellen beim HN-Protein gefunden, die als Schutz vor proteolytischem Verdau und als Signal für den intrazellulären Transport dienen [39]. Die potentiellen N-Glykosylierungen (Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr) befinden sich an den Stellen 12-14, 127-129, 284-286, 329-331, 400-402, 448-450, 464-466, 507-509 und 514-516. Von diesen werden vermutlich jedoch nur sechs genutzt, da zwei dieser Stellen Cystein-Reste (127-129 und 464-466) und eine Stelle (514-516) einen Prolin-Rest als variable AS (X) aufweisen und so nicht glykosyliert werden können [24,39], sowie eine Glykosylierungsstelle (12-14) sich in der zytoplasmatischen Region befindet. Oligosaccharide können nicht nur die Stabilität und die Löslichkeit von Proteinen beeinflussen, sondern auch die Konformation.

Auf der Virusoberfläche liegen HN-Proteine als über Disulfidbrücken-verbundene Homo-Dimere vor, die je nach HN-Konzentration nicht-kovalent oder Disulfid-verbundene Tetramere bilden [42]. Bei einer MuV Infektion übernimmt HN drei Funktionen: Erkennung von Sialinsäure enthaltenden Rezeptoren mittels Hämagglutinin Aktivität (HA), Förderung der Fusions-Aktivität des F-Proteins und einer Aktivität Neuraminidase Aktivität (NA), die die Sialinsäurereste von neuen Viruspartikeln entfernt, um eine Selbst-Agglutination zu verhindern [41,43,44].

1.4 Die Immunantwort

Das Immunsystem des Menschen ist in der Lage Krankheitserreger wie Bakterien, Parasiten, Pilze oder Viren zu erkennen und den Organismus vor einer Infektion zu schützen. Man unterteilt die angeborene und adaptive (erworbene) Immunität. Die angeborene Immunantwort basiert auf einem großen Repertoire an unveränderlichen Rezeptoren (PRRs = *Pattern Recognition Receptor*), kodiert von rekombinierenden Genen, die pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMP = *Pathogen Associated Molecular Pattern*) erkennen können. Wichtig bei einer Immunantwort ist die Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Strukturen. Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort kann durch eine Adaptive ein immunologisches Gedächtnis erstellt werden, das durch spezifische Erkennung von Pathogenen eine erneute Infektion verhindert. Dieser Schutz basiert auf der klonalen Selektion von Lymphozyten. Diese besitzen durch zufällige Rekombination von variablen Rezeptorsegmenten hochspezifische Rezeptoren. Des Weiteren unterteilt man diese Antigenrezeptoren in Oberflächenimmunglobuline der B-Zellen und in kleinere Antigenrezeptoren der T-Zellen. B-Zellen erkennen Antigene außerhalb von Körperzellen, während T-Zellen Antigene erkennen können, die von antigenpräsentierenden Zellen (APCs = *Antigen Presenting Cells*) auf Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHCs = *Major Histocompatibility Complex*) präsentiert werden. T-Lymphozyten lassen sich in unterschiedliche Typen einteilen (zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen) und sind in der Lage die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen einzuleiten. Diese sezernieren Antikörper (AK), auch Immunglobuline (Ig) genannt, die sowohl im Blutplasma als auch in extrazellulären Flüssigkeiten vorkommen [45].

1.4.1 Klassifikation und Eigenschaften von Antikörper

Antikörper (AK) sind eine sezernierte Form der B-Zellrezeptoren und sind, wie in Abbildung 3 zu erkennen, Y-förmig aufgebaut. Alle AK bestehen aus vier gepaarten schweren und leichten Polypeptidketten. Die schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die leichten Ketten kommen in zwei Typen vor (Lambda- und Kappa-Ketten), jedoch treten beide Typen niemals zusammen in einem AK auf. Ein AK Molekül lässt sich durch proteolytische Spaltung in drei Fragmente teilen, zwei identische Fab-Fragmente (*fragment antigen binding*) und ein Fc-Fragment (*fragment crystallizable*). Die Fab-Fragmente enthalten die variablen Regionen und können über diese eine Vielzahl von Antigenen binden. Das Fc-Fragment lässt sich leicht kristallisieren und interagiert mit Effektormolekülen und Effektorzellen. Die Klasse der AK wird anhand der konstanten Regionen bestimmt und kann eine von fünf Isotypen, (IgM, IgD, IgG, IgGA und IgE) annehmen. Die IgG-AK lassen sich

zusätzlich in vier Unterklassen (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) und die IgA-AK in zwei Unterklassen (IgA1 und IgA2) einteilen.

Nach Erkennung eines Antigens löst jede der fünf Ig-Klassen einen bestimmten Effektormechanismus zur Beseitigung aus. Der direkte Weg zur Inaktivierung ist die Neutralisation eines Erregers. Dabei gehen AK eine Bindung mit dem Antigen ein, um eine Wechselwirkung mit den Zellen und somit eine Infektion zu verhindern. Eine zweite Möglichkeit ist die Opsonisierung. Dabei dienen AK zur Bedeckung und Markierung von Pathogenen für Phagozyten, die die konstanten Regionen von AK erkennen und so Pathogene aufnehmen und eliminieren können. Die dritte Funktion von AK beruht auf der Aktivierung des Komplementsystems, das die Opsonisierung beschleunigt und Bakterien lysiert.

Bei einer humoralen Immunantwort (Bildung von AK durch B-Lymphozyten) werden zuerst IgM-AK gebildet, die sich vor allem im Blut befinden. Durch ihre Pentamerstruktur sind sie in der Lage große Mengen an Antigenen zu binden und das Komplementsystem zu aktivieren. Im Anschluss daran erfolgt ein Klassenwechsel und es werden, dem Wirkungsbereich im Körper entsprechend, Isotypen gebildet. IgA-AK können in Blut und extrazelluläre Flüssigkeiten übertreten und von dort aus in das Darmlumen gelangen, um Toxine und Viren zu neutralisieren. IgE-AK befinden sich gebunden an Mastzellen direkt unterhalb der Körperoberfläche. Antigene aktivieren die an IgE-AK-bindenden Mastzellen, die eine Allergie charakteristische Reaktionskette auslösen. IgG-AK zeigen eine vergleichsweise hohe Affinität zu Antigenen und kommen im Blut und in extrazellulärer Flüssigkeit vor und können Antigene neutralisieren, opsonisieren oder das Komplementsystem aktivieren. IgD-AK sind in geringen Mengen im Serum nachweisbar, allerdings ist über deren Funktion wenig bekannt [45].

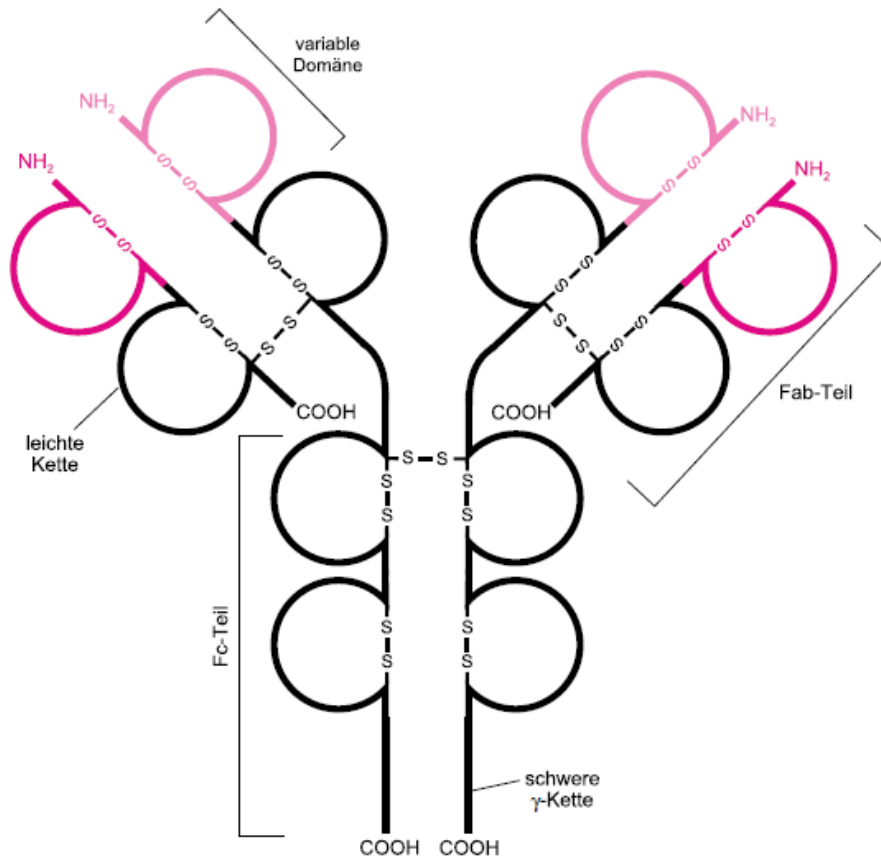


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Antikörpers am Beispiel IgG.

Rot: Variable Domänen, **Schwarz:** konstante Domänen [30]

1.4.2 Bedeutung neutralisierender Antikörper bei der MuV-Immunität

Die Impfung mittels MuV Vakzine bzw. eine MuV Erstinfektion sorgt für eine lebenslang anhaltende Immunität. Verantwortlich für diesen Schutz sind die neutralisierenden AK. Diese binden hauptsächlich an das HN-Protein und blockieren die zelluläre Rezeptorbindedomäne oder verhindern eine Interaktion zwischen HN- und F-Protein, was die Fusion zwischen Virus- und Wirtszellmembran und somit die Infektion verhindert.

1.4.2.1 Neutralisierende Epitope des HN-Proteins

Die Bindung zwischen Antigen und AK beruht auf reversiblen, nicht-kovalenten Wechselwirkungen. AK erkennen nur kleine Bereiche innerhalb eines Polysaccharids oder eines Proteins, die als Epitope bezeichnet werden. Man unterscheidet kontinuierliche und diskontinuierliche Epitope. Während kontinuierliche Epitope einem zusammenhängenden Bereich der Polypeptidkette entsprechen, entstehen diskontinuierliche Epitope erst durch

Faltung der Polypeptidkette. Dadurch werden nicht zusammenhängende Sequenzen in räumliche Nähe zueinander gebracht [45].

RNA-Viren zeigen aufgrund der hohen Mutationsrate der RNA-Polymerase eine genetische Variabilität [16]. Das MuV besitzt im gesamten Genom eine Mutationsrate von 10^{-3} - 10^{-4} Nukleotidsubstitutionen pro Jahr, was auch zu Mutationen innerhalb des HN-Proteins führt, die über die gesamte Sequenzlänge und ohne Auftretismuster verteilt sind [46].

Neutralisierende Epitope des MuV sind auf dem F- und HN-Protein lokalisiert. Im HN-Protein wurden sie in den AS (Aminosäure) Regionen 265-288, 329-340 und 352-360 identifiziert [47-49] und umfassen 45 AS bzw. machen 7,7 % des kompletten HN-Proteins aus. Zytoplasmatische sowie transmembrane Regionen (1-55 AS) von HN sind keine hoch konservierten Regionen [1], weshalb neutralisierende Epitope ausschließlich im extrazellulären Teil des HN-Proteins zu finden sind.

Bei Untersuchungen der drei kartierten antigenischen Regionen des HN-Proteins verschiedener Stämme waren 51,5 % aller AS-Sequenzen identisch, 26,5 % unterschieden sich in einer AS und der Rest unterschied sich in bis zu fünf AS. Je nachdem, welches Epitop erkannt wird, kann ein AK gegen das HN-Protein sowohl mehrere Genotypen neutralisieren [50] als auch spezifisch an einen bestimmten Stamm binden. Beispielsweise führt das Vorhandensein von Glutamin an Stelle von Prolin an Position 354 und Asparaginsäure an Stelle von Glutaminsäure an Position 356 in den Stämmen der Genotypen C-J im Vergleich zum Genotyp A dazu, dass bestimmte monoklonale AK, die nach einer Impfung mit dem Genotyp A gebildet wurden, die Genotypen C, D, G, H oder I nicht neutralisieren können [51]. Auch beim Vergleich von Impfstämmen, die alle dem selben Genotyp angehören (Genotyp A) wurden AS-Unterschiede gefunden. Beispielsweise unterscheiden sich die Impfstämme JL-Typ 2 und JL-Typ 5 in vier AS [47-49]. Um sicher zu gehen, dass nach einer Impfung AK gebildet werden, die möglichst viele Stämme neutralisieren, werden diese beiden Stämme in Vakzinen im Verhältnis 1:5 eingesetzt [52]. Kulkarni-Kale *et al.* stellten des Weiteren fest, dass es einige MuV-Stämme gibt, die nicht glykosyliert werden können. Diese post-translationale Modifikation könnten ebenfalls stammspezifische antigenische Variationen zur Folge haben [53].

Šantak *et al.* erkannten neben den bereits bekannten neutralisierenden Epitopen drei weitere potentielle antigenische Regionen (113-130, 375-403 und 440-443), in denen bei vielen Wildtypstämmen Mutationen auftraten [1].

Fälle, in denen geimpfte Personen an Mumps erkrankten, sind auf Impffehler, meist durch falsche Lagerung des Impfstoffes oder bei der Verabreichung der Impfdosen zurückzuführen [54]. Ebenso kann bei einem primären Impfversagen die Bildung von AK ausbleiben und es besteht kein lebenslanger Schutz bei einer erneuten Infektion. Trotz des Auftretens stammspezifischer AK gibt es bislang keinen Beweis des Anhäufens von evolutionären Impf-Flucht- (escape) Mutanten [55]. Diese Ergebnisse erfahren durch das Auftreten von Ausbrüchen in

hoch-vakzinierten Gruppen eine Erweiterung, denn die Krankheitsfälle sind alle mit dem neuen Genotyp G assoziiert. Große Ausbrüche wurden in jüdischen Familien New Yorks [56], aber auch bei europäischen College- und Universitätsstudenten beobachtet [57]. Die Mehrzahl der Erkrankten war zweimal geimpft. Insofern stellt sich die Frage, ob das neu auftretende Mumpsvirus des Genotyps G eine Impfdurchbruchsituation verursacht hat.

1.5 Zielsetzung

Seit über 50 Jahren zählt der Jeryl Lynn (JL) - Stamm zu einem der Impfstämme, die zur Immunisierung gegen das MuV verwendet werden. Eine Impfung konnte ebenso wie eine bereits durchgestandene Erkrankung einen lebenslangen Schutz bieten. In den letzten Jahren kam es in vielen Ländern Nord-Amerikas, sowie in Europa, u.a. auch in Deutschland, vermehrt zu Erkrankungen von bereits geimpften oder durch Erstinfektion immunisierten Personen. Diese Erkrankungen erfolgten zahlreich mit dem Genotyp G, während Impfstämme häufig dem Genotyp A angehören, weshalb Diskussionen über die Notwendigkeit eines neuen Impfstoffes in vergangener Zeit vermehrt auftraten.

Faktoren, die zur Klärung der Impfstoffwirksamkeit beachtet werden müssen, sind unter anderem die Anzahl der verabreichten Impfdosen, die mögliche abnehmende Immunität im Laufe des Lebens, die Zeitspanne der zurückliegenden Impfung und die genetische Evolution des MuV. In einer Studie des Robert Koch-Instituts wurden Kinder untersucht, die unterschiedliche Anzahlen an Impfdosen erhielten. Mittels eines *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISA) wurden die IgG-Titer bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass eine erhöhte Anzahl an Impfdosen nicht die Anzahl der IgG-AK steigert und somit auch nicht die neutralisierende Kapazität gegen den Genotyp G erhöhen kann. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die neutralisierende Kapazität nicht mit dem Alter oder der Zeitspanne der zurückliegenden Impfung korreliert. Dabei wurden Kinder, deren Impfung sieben bis elf Monate zurücklag, mit Jugendlichen, bei denen die Impfung 11 bis 16 Jahre zurücklag, verglichen [12]. Folglich bleibt die Veränderung der Epitope durch Evolution des MuV zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung zum Einfluss von Mutationen im HN-Protein auf die Bindung und in weiterführenden Arbeiten auf die neutralisierende Kapazität von MuV AK. Um den Einfluss untersuchen zu können, wurden in der vorherigen Laborarbeit sechs Konstrukte hergestellt. Diese beinhalten Mutationen im HN-Protein, die sich in Bereichen befinden, die bereits als neutralisierende Epitope (352-360) oder potentielle Regionen bei der Neutralisierung (113-130, 375-403 und 440-443) beschrieben wurden [1,49]. Um die Bindung von MuV AK zu testen wird als Nachweisverfahren ein Immunfluoreszenz Assay (IFA) durchgeführt. Dafür müssen zuerst geeignete Methoden zur Färbung mit Patienten-

seren etabliert werden. Dabei sollen Seren von geimpften oder natürlich immunisierten Patienten, die bereits MuV AK gebildet haben, verwendet werden. Nach der erfolgreichen Etablierung können anschließend die sechs HN-Konstrukte hinsichtlich der Bindung von MuV AK untersucht werden. Dafür sollen neben den zur Etablierung verwendeten auch Seren untersucht werden, die von Personen stammen, die trotz eines vollständigen Impfschutzes oder einer durchgestandenen Infektion reinfiziert wurden.

Weiterhin sollen monoklonale AK eingesetzt werden, die von C. Örvell zur Verfügung gestellt wurden, um das HN-Protein in der Immunfluoreszenz zu detektieren.

2 Material

2.1 Chemikalien

BSA	Roth (D), PAA (A)
Ethanol	Roth (D)
FKS	Pan Biotech (D)
Glycerol	Roth (D)
Isopropanol	Roth (D)
L-Glutamin	Invitrogen (USA)
PFA	Electron Microscopy Sciences (USA)
ProLong® Gold Antifade + DAPI	Invitrogen (USA)
TritonX-100	Merck (D)
Tween-20	Euroimmun (D)

2.2 Enzyme

Trypsin EDTA	PAA (A)
--------------	---------

2.3 Antikörper

Anti-F (monoklonal aus der Maus)	Millipore (USA)
Anti-Human IgG Fab Fragment (polyklonal aus der Ziege), gekoppelt mit Cy2	Jackson Immuno Research (USA)
Anti-Human IgG Fc gamma Fragment (polyklonal aus der Ziege), gekoppelt mit Alexa Fluor 488	Jackson Immuno Research (USA)
Anti-Maus IgG Fab Fragment, (polyklonal aus der Ziege) gekoppelt mit Cy2	Dianova (D)
Anti-Maus IgG Fab Fragment (polyklonal aus der Ziege), gekoppelt mit Cy3	Dianova (D)
Anti-Maus IgG Fc gamma Fragment (polyklonal aus der Ziege), gekoppelt mit FITC	Jackson Immuno Research (USA)
Anti-Myc (monoklonal aus der Maus)	Sigma (USA)
Anti-NP (monoklonal aus der Maus)	Santa Cruz (USA)
Patientenserum 07-00124 (IgG 28)	NRZ

Patientenserum 02-00727 (IgG 40)	NRZ
Patientenserum 08-00446 (IgG 71)	NRZ

2.4 Plasmide

pCMV-Myc-HN-JL	Expression von MuV HN _{JL} (C. Rödner)
pCMV-Myc-EGFP	Expression von EGFP (A.Olszewski)
pCMV-Myc-F-JL	Expression von MuV F _{JL} (C. Rödner)

2.5 Medien

2.5.1 Medien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen

Medium	Komponenten
DMEM	37 g NaHCO ₃
	DMEM Pulver (Gibco TM , UK) für 10 l; ad H ₂ O; pH 7,2 (HCl);
	sterilfiltrieren

2.6 Viren und Zelllinien

2.6.1 Viren

MuV Jeryl Lynn (JL)	Paul-Ehrlich-Institut (D)
---------------------	---------------------------

2.6.2 Eukaryotische Zelllinien

Die HEK293G Zelllinie entstand ursprünglich durch Transformation von Nierenzellen mit DNA-Fragmenten vom Adenovirus 5. Die Nierenzellen stammten von einem abgetriebenen, aber gesunden Fötus ab [58].

Die Cos7 Zelllinie entstand durch Immortalisierung einer CV-1 Zelllinie mit einem SV40 Virus. Die CV-1 Zelllinie wurde aus Nierenzellen der Grünen Meerkatze abgeleitet [59].

Die VERO Zelllinie wurde 1960 von Y. Yasumura und Y. Kawakita ebenfalls von Nierenzellen einer gesunden, adulten Grünen Meerkatze abgeleitet [60].

Zelllinie	Organismus	Organ	Medium	Zusätze
HEK293G	Mensch	Niere	DMEM	10 % FKS
				1 % (v/v) Glutamin (entspricht 2 mM)
				1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin Lösung (entspricht 0,1 U/ml Penicillin und 0,1 µg/ml Streptomycin)
Cos7	Cercopithecus aethiops	Niere	DMEM	siehe HEK293G
VERO	Cercopithecus aethiops	Niere	DMEM	siehe HEK293G

2.7 Puffer

2.7.1 Angesetzte Puffer

Blockpuffer I (Immunfluoreszenz Assay)	0,05 % Tween20, 1 % BSA in PBS
PBS	140 mM NaCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2
	2 mM KCl
	in H ₂ O
Waschpuffer I (Immunfluoreszenz Assay)	0,05 % Tween in PBS

2.8 Kits

Calcium Phosphate Transfection Kit	Sigma (USA)
X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent	Roche (D)

2.9 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Roth (D)
Einweg-Reaktionsgefäße	TPP (CH)
Glaspipetten	Brand (D), Hirschmann (D)
Handschuhe	Roth (D)
Kanülen	Braun (D)
Objektträger	Roth (D)
Pipettenspitzen	Thermo Scientific (USA)
Zellkulturgefäße :	
Flaschen	Nunc (DK)
Platten	Costar (USA), TPP (CH)

2.10 Geräte

Brutschrank (CO ₂ Inkubator)	Binder (D)
Durchlichtmikroskop	Nikon (J), Zeiss (D)
Feinwaage	Sartorius (D)
Gefrierschränke	AEG (D), Liebherr (D), Bosch (D)
Horizontalschüttler	Biometra (D)
Konfokales Laser-Raster-Mikroskop kLSM 780	Zeiss (D)
Kühlschränke	Bosch (D)
Laborzentrifugen:	
Biofuge fresco	Heraeus (D)
Centrifuge 54/5D	Eppendorf (D)
Pipetboy	Integra Bioscience (D)
Pipetten	Eppendorf (D), Abimed (D), Rainin (USA)
Sterilbank	Thermo Scientific (USA)
Stoppuhr	Roth (D)
Tischzentrifugen	Eppendorf (D), Thermo Scientific (USA)
Vakuumpumpe Vacusafe comfort	Integra Bioscience (D)
Vortex Genius 3	Ika (D)
Wasserbad	Haake (D)

2.11 Software und Webseiten

EndNote X6	Thomson Reuters (USA)
FileMaker Pro	FileMaker Inc. (D)
Geneious Pro	Biomatters Ltd. (NZ)
NCBI-Homepage	www.ncbi.nlm.nih.gov/
Microsoft Office 2010	Microsoft (USA)
ZEN2010	Zeiss (D)

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die eingesetzten HEK293G und Cos7 Zellen wurden in 75 cm² großen Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert (wenn nicht anders erwähnt, gelten stets diese Kultivierungsbedingungen). Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens, nach etwa 3 bis 4 Tagen, wurden die Zellen passagiert. Vor dem Ablösen des Zellrasens wurde dieser zwei Mal mit 10 ml PBS gewaschen, um Mediumreste, tote Zellen und Proteine zu entfernen. Anschließend wurde die Kultur mit 3-5 ml Trypsin EDTA für eine Minute inkubiert. Durch das Abgießen des Trypsins wurden weiterer tote Zellen und Zelltrümmer entfernt. Zum Ablösen der Zellen wurde die Kulturflasche mit dem verbleibenden Trypsin im Brutschrank inkubiert. Nach fünf Minuten wurden die abgelösten Zellen in 9 ml frischem, Medium (Abschnitt 2.6.2) aufgenommen. In einer neuen 75 cm² Zellkulturflasche wurden 18 ml Medium vorgelegt und die entsprechende Zellsuspension, je nach Verdünnung, dazugegeben. Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

3.1.2 Transfektion von eukaryotischen Zelllinien

Unter einer Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Die Synthese des gewünschten Proteins ist dabei nur möglich, wenn die einzubringende Fremd-DNA als Expressionsplasmid vorliegt, dessen offener Leserahmen des zu exprimierenden Proteins unter Kontrolle eines eukaryotischen Promotors liegt. Zur Einbringung in Zellen können entweder physikalische Methoden (Elektroporation) oder, wie in

dieser Arbeit, chemische Methoden (Calciumphosphat-Transfektion und X-tremeGENE) verwendet werden.

3.1.2.1 Calciumphosphat-Transfektion

Die bekannteste Methode ist die Calciumphosphat-Transfektion. Säugerzellen sind dabei in der Lage Calciumphosphat/DNA Kopräzipitate zu phagozytieren, welche bei einem Gemisch von Calciumchlorid und Natriumphosphat (HEPES-Puffer) ausfallen und eine Bindung der Fremd-DNA ermöglichen.

Für die Transfektion wurde das *Calcium Phosphate Transfection Kit* (Sigma) verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden in einer 24-Loch-Platte Zellen in einem geeigneten Verhältnis ausgesät (1 ml pro Loch), sodass am nächsten Tag der Zellrasen eine Konfluenz von 50-60 % erreichte. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt (0,5 ml pro Loch) und nach zwei Stunden die Transfektionslösung tropfenweise zum Medium in der Loch-Platte hinzugegeben (24 µl pro Loch). Für die Herstellung der Transfektionslösung wurden in zwei getrennten Reaktionsgefäßen die Reagenzien vorgelegt (Tabelle 1). Das Reaktionsgefäß Nr.2 wurde anschließend auf niedriger Stufe mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und dabei langsam die Reagenzien aus Reaktionsgefäß Nr.1 hinzugegeben. Zur Komplexbildung wurde die Transfektionslösung 20 min bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Alle Kitkomponenten wurden bei RT aufgetaut. Durch vorsichtiges Schwenken der Platte wurde eine bessere Verteilung der Lösung sichergestellt. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellen im Brutschrank. 16-20 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt (1 ml pro Loch) oder direkt ein Immunfluoreszenz Assay (Abschnitt 3.2.1) vorgenommen.

Tabelle 1: Reaktionsansätze pro Loch (24-Loch-Platte) bei einer Calciumphosphat-Transfektion

Reaktionsgefäße	Nr.1	Nr.2
	1,0 µg DNA	12,0 µl HEPES-Puffer
	1,2 µl CaCl ₂	
	Ad 12 µl dH ₂ O	

3.1.2.2 X-tremeGENE-Transfektion

Die Transfektion von Cos7 und Vero Zellen erfolgte mit dem *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* Kit (Roche). Das Transfektionsreagenz wurde in 80 %igen Ethanol geliefert und ist ein Gemisch aus Lipiden und anderen, vom Hersteller geschützten, Komponenten. Um am Vortag ausgesäte Zellen ($4 \cdot 10^4$ Zellen pro Loch) mit X-tremeGENE zu transfizieren, wurde zwei Stunden vor der Transfektion das Medium gewechselt (0,5 ml pro Loch). Zur Herstellung der Transfektionslösung wurden alle Kitkomponenten bei RT aufgetaut und

das Transfektionsreagenz mit Hilfe eines Vortexers gründlich durchmischt. Anschließend wurde serumfreies Medium in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und die entsprechende DNA Menge und das Transfektionsreagenz im Verhältnis 1:2 hinzugefügt (Tabelle 2). Wichtig war dabei, dass das Transfektionsreagenz in das Medium pipettiert wurde und nicht in direkten Kontakt mit dem Reaktionsgefäß kam. Zusätzlich war zu beachten, dass mindestens ein Transfektionsansatz von 100 µl hergestellt werden muss, da sonst die Transfektionseffizienz vermindert ist. Zur Komplexbildung wurde die Transfektionslösung 20 min bei RT inkubiert. Die Zugabe (25 µl pro Loch) der Transfektionslösung erfolgte tropfenweise zu dem Medium auf den Zellen. Durch vorsichtiges Schwenken der Platte wurde eine bessere Verteilung der Lösung sichergestellt. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellen im Brutschrank. Ein Mediumwechsel war bis zur Fixierung der Zellen (Abschnitt 3.2.1) nicht nötig.

Tabelle 2: Reaktionsansätze pro Loch (24-Loch-Platte) bei einer X-tremeGENE-Transfektion

24-Loch-Platte	Reagenzien
	25 µl serumfreies Medium
	0,5 µg DNA
	1 µl X-tremeGENE Reagenz

3.1.3 Infektion eukaryotischer Zellen

Die eukaryotische Zelllinie Vero wurde mit dem MuV Impfstamm Jeryl Lynn (JL) infiziert, um anschließend die Expression des HN-Proteins mittels AK nachweisen zu können. Am Tag vor der Infektion wurden Vero Zellen in einer 24-Loch-Platte in einem geeigneten Verhältnis ausgesät, sodass am nächsten Tag der Zellrasen eine Konfluenz von 60-70 % erreichte. Für die Infektion wurde zunächst die Zusammensetzung der Virussuspension nach der Formel in Abbildung 4 berechnet. MOI (*multiplicity of infection*) beschreibt das Verhältnis von Viruspartikeln zu den zu infizierenden Zellen. Bei einer MOI von 1 werden für die Infektion genauso viele Viruspartikel eingesetzt wie zu infizierende Zellen vorhanden sind. Vor der tropfenweisen Zugabe der Virussuspension wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe der Virussuspension inkubierten die Zellen eine Stunde im Brutschrank. Die Platte wurde alle 10-15 min geschwenkt, um eine bessere Virusverteilung zu gewährleisten. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut einmal mit PBS gewaschen und serumhaltiges Medium (1 ml pro Loch) hinzugegeben. Für ein Loch einer 24-Loch-Platte wurden 200 µl Virussuspension angesetzt. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung fixiert (Abschnitt 3.2.1).

$$V = \frac{\text{Zellzahl pro Loch} \times \text{MOI}}{\text{Virustiter}} \times \text{Anzahl der zu infizierenden Löcher}$$

Abbildung 4: Formel zur Berechnung der Virussuspension.

3.2 Analyse von Proteinen

3.2.1 Immunfluoreszenz Assay (IFA)

Zum Nachweis von Proteinen, exprimiert in eukaryotischen Zellen, wurde ein Immunfluoreszenz Assay (IFA) durchgeführt. Um Proteine unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, gibt es die Möglichkeit autofluoreszierende Proteine zu verwenden, die nicht mit Antikörpern (AK) gekoppelt werden, oder Proteine mit einem spezifischen primären AK zu markieren, der mit Hilfe eines fluoreszenz-markierten Sekundär-AK detektiert wird. Dafür wurden HEK293G, Cos7 oder Vero Zellen einer konfluenten 75 cm² Flasche in einer 24-Loch-Platte auf Deckgläschen (DG) in einem geeigneten Verhältnis ausgesät, sodass am Folgetag eine Konfluenz von 50-70 % erreicht war. Anschließend erfolgte entweder eine Transfektion der Zellen (Abschnitt 3.1.2) mit einem Plasmid, das für das gewünschte Protein kodiert (Abschnitt 2.4) oder die Infektion der Vero Zellen mit dem MuV JL (MOI 0,02) (Abschnitt 3.1.3). Nachdem die transfizierten Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert worden waren, konnte am Folgetag die Immunfluoreszenzfärbung vorgenommen werden. Die infizierten Zellen konnten erst 48 h nach der Infektion gefärbt werden. Bei allen Zellen wurde für die Färbung das Medium abgenommen und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei RT mit 300 µl 4 %igen Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift folgte die Permeabilisierung der Zellen mit 300 µl PBS/0,1 % Triton-X100 pro DG für 10 min. Die Zellen wurden drei Mal mit Waschpuffer I gewaschen und eine Stunde mit dem Blockpuffer I auf dem Schüttler oder für unterschiedliche Zeiten in 20 µl MuV-IgG negativen Patientenserum (1:5 verdünnt in Blockpuffer I) inkubiert, um unspezifische, freie Bindungsstellen abzusättigen. Während der Inkubation wurden die AK-Ansätze entsprechend Tabelle 3 vorbereitet. Pro DG wurden 20 µl AK-Ansatz hergestellt und in einer Schale, ausgelegt mit Parafilm auf feuchtem Filterpapier, vorgelegt. Nach dem Blocken wurden die DG aus der 24-Loch-Platte herausgehoben, mit den Zellen nach unten auf den entsprechenden AK-Ansatz gelegt und für 30 min bis eine Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. In der Zeit der Inkubation wurde in der 24-Loch-Platte neuer Waschpuffer I vorgelegt, sodass nach der Zurückführung der DG in die entsprechenden Löcher nur zwei zusätzliche Waschschriffe notwendig waren. Im Anschluss wurden 150 µl des entsprechenden sekundären AK-Ansatzes (Tabelle 4) pro Loch hinzugegeben und im Dunkeln für 30 bis 45 min auf dem Schüttler inkubiert. Zum Schluss folgten drei Waschschriffe mit Waschpuffer I und zwei mit PBS. Nach kurzem Spülen mit dH₂O wurden die DG

auf Objektträgern mit 7,5 µl *ProLong® Gold Antifade + DAPI* (Invitrogen), welches DAPI zur Visualisierung der Zellkerne enthält, fixiert. Abschließend wurden die angefertigten Präparate mit Hilfe eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops 780 (kLSM) (Zeiss) ausgewertet. Dabei werden die gekoppelten Fluorophore durch Laser, die eine Wellenlänge im Absorptionsmaximum der Fluorophore besitzen angeregt. Das Programm *Zen2010* diente zur grafischen Darstellung der Ergebnisse.

Alternativ zu der beschriebenen sukzessiven Markierung der Proteine zunächst mit einem Primär- und anschließend mit einem Sekundär-AK, kann auch vor der Inkubation der Primär-AK mit fluoreszenz-gekoppelten Fab-Fragmenten markiert werden. Diese Methode ist v.a. dann von Vorteil, wenn verschiedene Primär-AK aus der gleichen Spezies verwendet werden, die dann zuvor mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert werden können. Hier wurde Patientenserum zunächst mit Cy2-markierten Fab-Fragmenten markiert. Pro DG wurden 20 µl des AK-Patienten-Ansatzes mit einer Endverdünnung von 1:5 hergestellt. In ein leeres 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 20 µl PBS vorgelegt. Zu den 20 µl PBS wurden pro DG 4 µl Patientenserum und 0,4 µl Cy2-markiertes Fab-Fragment, das gegen menschliche IgG-AK gerichtet ist, hinzugegeben und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde zum Abfangen der ungebundenen Fab-Fragmente pro DG 0,2 µl Mensch-IgG hinzugefügt und der Ansatz erneut für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden pro DG 20 µl Blockpuffer I hinzugegeben. Die Inkubation der DG mit den markierten Patientenseren erfolgte für eine Stunde bei 4 °C im Dunkeln in der feuchten Kammer. Anschließend wurden die Präparate wie zuvor beschrieben auf Objektträgern fixiert und am kLSM 780 ausgewertet.

Tabelle 3: Primäre Antikörper-Ansätze im Immunfluoreszenz Assay

Antikörper	Verdünnung
Anti-F	1:1000
Anti-HN IgG (C. Örvell)	1:50
Anti-Myc	1:1000
Anti-NP	1:200
Patient 02-00727 (IgG 40 IU/ml)	1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100
Patient 02-01000 (IgG 36 IU/ml)	1:2, 1:10
Patient 07-00542 (IgG 66 IU/ml)	1:1
Patient 07-00124 (IgG 28 IU/ml)	1:2, 1:10, 1:50
Patient 08-00446 (IgG 71 IU/ml)	1:2, 1:10, 1:50
Patient 12-00282 (negativ)	1:10
Patient 13-00025 (negativ)	1:2, 1:10, 1:50
Patient 13-00241 (negativ)	1:2, 1:10, 1:50

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper-Ansätze im Immunfluoreszenz Assay

Antikörper	Verdünnung
Anti-Maus IgG, gekoppelt mit FITC	1:200
Anti-Maus IgG, gekoppelt mit Cy2	1:50
Anti-Maus IgG, gekoppelt mit Cy3	1:100
Anti-Human IgG, gekoppelt mit Cy2	1:50
Anti-Human IgG gekoppelt mit Alexa Fluor 488	1:100

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Mutationen im HN-Protein auf die Bindungsfähigkeit von polyvalenten AK gegen das MuV aus Patientenseren zu untersuchen. Während der Laborarbeit wurden sechs Plasmid-Konstrukte mit Mutationen im HN-Protein hergestellt, die für die vorliegende Bachelorarbeit zur Verfügung standen. Vor der Untersuchung der sechs HN-Mutanten mussten Methoden zur Immunfluoreszenzfärbung mit Patientenseren etabliert werden. Zusätzlich wurden monoklonale AK (C. Örvell) zum Nachweis des HN-Proteins eingesetzt.

4.1 Herstellung und Expression von HN-Proteinen mit AS-Austauschen in AK Epitopen (Ergebnisse der Laborarbeit)

Das Nationale Referenzzentrum (NRZ) für Mumps, Masern, Röteln am Robert Koch-Institut hat Mumpsviren aus Patientenproben isoliert, sequenziert und die AS-Sequenz des HN-Proteins dieser Wildtypviren mit der von Impfviren verglichen (Abbildung 5). Dabei wurden gehäuft AS-Substitutionen in Bereichen beobachtet, die als neutralisierende Epitope vermutet werden (113-130, 375-403 und 440-443) [1]. In den Regionen bereits bekannter neutralisierender Epitope (265-288, 329-340 und 352-360) [47-49] gab es nur wenige Mutationen im Vergleich zum Impfstamm. Daher wurde eine Mutante mit veränderten AS im Bereich bekannter Epitope an den Positionen 354 und 356 hergestellt und fünf Mutanten mit Mutationen in den potenziell neutralisierenden Epitopen. Die hergestellten Mutanten sind Abbildung 6 und Tabelle 5 und zu entnehmen.

Abbildung 5: AS-Sequenz-Vergleich des HN-Proteins von Wildtypstämmen mit Impfstämmen.

Konsensus	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
11-00283	MEPSK	FE	TS	DS	AT	FA	PG	PV	SN	AK	K	T	TC	FI	LA
11-00308	MEPSK	FE	TS	DS	AT	FA	PG	PV	SN	AK	K	T	TC	FI	LA
11-00309	MEPSK	FE	TS	DS	AT	FA	PG	PV	SN	AK	K	T	TC	FI	LA
11-00315	MEPSK	FE	TS	DS	AT	FA	PG	PV	SN	AK	K	T	TC	FI	LA
11-00356	MEPSK	FE	TS	DS	AT	FA	PG	PV	SN	AK	K	T	TC	FI	LA
11-00405	MEPSK	FE	TS	DS	AT	FA	PG	PV	SN	AK	K	T	TC	FI	LA
11-00482	MEPSK	FE	TS	DS	AT	FA	PG	PV	SN	AK	K	T	TC	FI	LA
11-00525	MEPSK	FE	TS	DS	AT	FA	PG	PV	SN	AK	K	T	TC	FI	LA
Jeryl-ynn	MEPSK	FE	TS	DS	AT	FA	PG	PV	SN	AK	K	T	TC	FI	LA
Mu19-90	MEPSK	FE	TS	DS	AT	FA	PG	PV	SN	AK	K	T	TC	FI	LA
MuSA-9	MEPSK	FE	TS	DS	AT	FA	PG	PV	SN	AK	K	T	TC	FI	LA
Phrix	MEPSK	FE	TS	DS	AT	FA	PG	PV	SN	AK	K	T	TC	FI	LA
Konsensus	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290
11-00283	FI	ED	VA	TH	DF	SI	GH	PL	NN	PS	FI	PT	AS	PG	NC
11-00308	FI	ED	VA	TH	DF	SI	GH	PL	NN	PS	FI	PT	AS	PG	NC
11-00309	FI	ED	VA	TH	DF	SI	GH	PL	NN	PS	FI	PT	AS	PG	NC
11-00315	FI	ED	VA	TH	DF	SI	GH	PL	NN	PS	FI	PT	AS	PG	NC
11-00356	FI	ED	VA	TH	DF	SI	GH	PL	NN	PS	FI	PT	AS	PG	NC
11-00405	FI	ED	VA	TH	DF	SI	GH	PL	NN	PS	FI	PT	AS	PG	NC
11-00482	FI	ED	VA	TH	DF	SI	GH	PL	NN	PS	FI	PT	AS	PG	NC
11-00525	FI	ED	VA	TH	DF	SI	GH	PL	NN	PS	FI	PT	AS	PG	NC
Jeryl-ynn	FI	ED	VA	TH	DF	SI	GH	PL	NN	PS	FI	PT	AS	PG	NC
Mu19-90	FI	ED	VA	TH	DF	SI	GH	PL	NN	PS	FI	PT	AS	PG	NC
MuSA-9	FI	ED	VA	TH	DF	SI	GH	PL	NN	PS	FI	PT	AS	PG	NC
Phrix	FI	ED	VA	TH	DF	SI	GH	PL	NN	PS	FI	PT	AS	PG	NC
Konsensus	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
11-00283	SP	SG	LE	GN	WA	TL	V	PG	VS	GI	Y	F	EN	K	L
11-00308	SP	SG	LE	GN	WA	TL	V	PG	VS	GI	Y	F	EN	K	L
11-00309	SP	SG	LE	GN	WA	TL	V	PG	VS	GI	Y	F	EN	K	L
11-00315	SP	SG	LE	GN	WA	TL	V	PG	VS	GI	Y	F	EN	K	L
11-00356	SP	SG	LE	GN	WA	TL	V	PG	VS	GI	Y	F	EN	K	L
11-00405	SP	SG	LE	GN	WA	TL	V	PG	VS	GI	Y	F	EN	K	L
11-00482	SP	SG	LE	GN	WA	TL	V	PG	VS	GI	Y	F	EN	K	L
11-00525	SP	SG	LE	GN	WA	TL	V	PG	VS	GI	Y	F	EN	K	L
Jeryl-ynn	SP	SG	LE	GN	WA	TL	V	PG	VS	GI	Y	F	EN	K	L
Mu19-90	SP	SG	LE	GN	WA	TL	V	PG	VS	GI	Y	F	EN	K	L
MuSA-9	SP	SG	LE	GN	WA	TL	V	PG	VS	GI	Y	F	EN	K	L
Phrix	SP	SG	LE	GN	WA	TL	V	PG	VS	GI	Y	F	EN	K	L
Konsensus	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590
11-00283	FI	TS	GS	SV	N	M	SW	I	PI	YS	TR	PG	SC	NG	EN
11-00308	FI	TS	GS	SV	N	M	SW	I	PI	YS	TR	PG	SC	NG	EN
11-00309	FI	TS	GS	SV	N	M	SW	I	PI	YS	TR	PG	SC	NG	EN
11-00315	FI	TS	GS	SV	N	M	SW	I	PI	YS	TR	PG	SC	NG	EN
11-00356	FI	TS	GS	SV	N	M	SW	I	PI	YS	TR	PG	SC	NG	EN
11-00405	FI	TS	GS	SV	N	M	SW	I	PI	YS	TR	PG	SC	NG	EN
11-00482	FI	TS	GS	SV	N	M	SW	I	PI	YS	TR	PG	SC	NG	EN
11-00525	FI	TS	GS	SV	N	M	SW	I	PI	YS	TR	PG	SC	NG	EN
Jeryl-ynn	FI	TS	GS	SV	N	M	SW	I	PI	YS	TR	PG	SC	NG	EN
Mu19-90	FI	TS	GS	SV	N	M	SW	I	PI	YS	TR	PG	SC	NG	EN
MuSA-9	FI	TS	GS	SV	N	M	SW	I	PI	YS	TR	PG	SC	NG	EN
Phrix	FI	TS	GS	SV	N	M	SW	I	PI	YS	TR	PG	SC	NG	EN

Abbildung 5: AS-Sequenz-Vergleich des HN-Proteins von Wildtypstämmen und Impfstämmen.

Ein Sequenzalignment wurde mit Hilfe des Programms Geneious von Patientenisolat-Wildtypstämmen (blau umrahmt) und Impfstämmen (rot umrahmt) vorgenommen. Die Konsensussequenz stellt die AS-Sequenz dar, die in der Summe am wenigsten von allen verglichenen Sequenzen abweicht und deren Auftretswahrscheinlichkeit somit am höchsten ist. Blau hinterlegt sind die AS dargestellt, die der Konsensussequenz entsprechen und rot hinterlegt die AS, die davon abweichen. Die drei orange-gefärbten Rechtecke markieren die drei neu entdeckten, potentiell neutralisierenden Epitope [1].

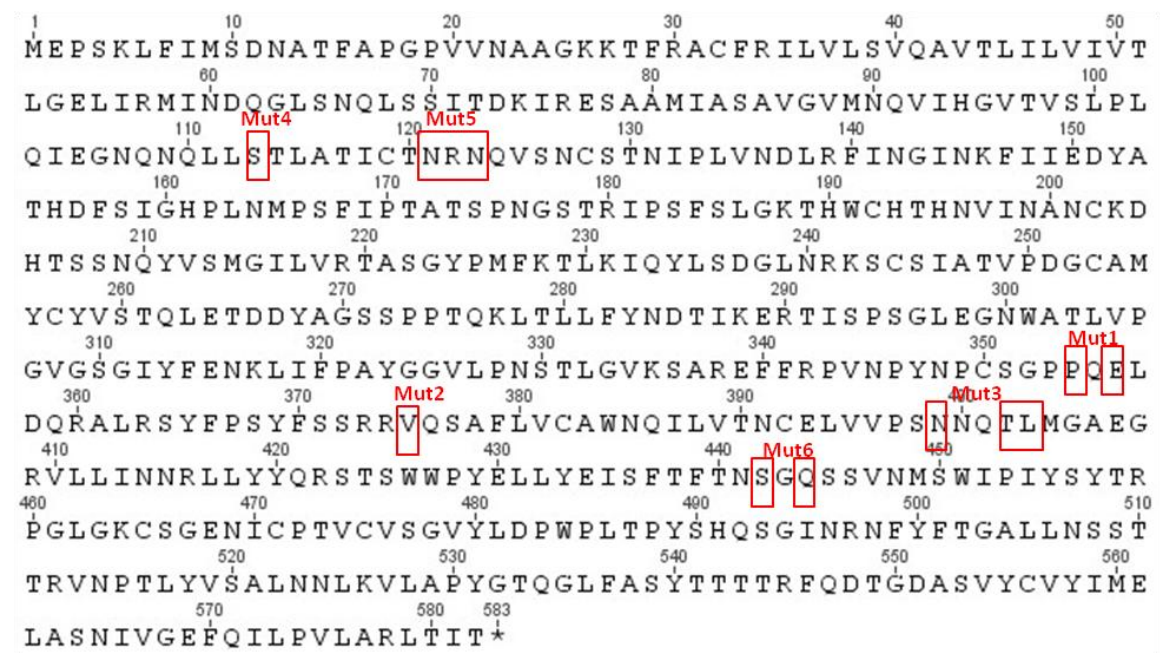


Abbildung 6: AS-Sequenz des HN-Proteins des Impfstammes JL.

Rot markiert sind die AS, die mit Hilfe einer Mutagenese verändert werden sollten. Über den Mutationen steht jeweils die Bezeichnung der Mutante.

Tabelle 5: Bezeichnung und Lokalisation der HN-JL Mutationen.

Mutanten	AS-Austausche	Plasmid-Bezeichnung
Mut1	P354Q, E356D	pCMV-Myc-HN-JL-Mut1
Mut2	V375I	pCMV-Myc-HN-JL-Mut2
Mut3	N399S, T402A, L403M	pCMV-Myc-HN-JL-Mut3
Mut4	S113A	pCMV-Myc-HN-JL-Mut4
Mut5	N121S, R122Q, N123K	pCMV-Myc-HN-JL-Mut5
Mut6	Y442S, Q444P	pCMV-Myc-HN-JL-Mut6

Während der Laborarbeit wurde die Expression der mutierten HN-Proteine mittels eines Immunfluoreszenz Assays nachgewiesen. Dafür wurden HEK293G Zellen auf Deckgläser (DG) in einer 24-Loch-Platte ausgesät und am darauffolgenden Tag mit Plasmiden, die die entsprechenden Mutationen enthalten, sowie dem Ursprungsplasmid (pCMV-Myc-HN-JL) transfiziert (Abschnitt 3.1.2). Die Plasmide kodieren für das jeweilige HN-Protein, das am N-Terminus ein Myc-Epitop besitzt und unter der Kontrolle eines CMV-Promotors steht. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert, permeabilisiert und anschließend gefärbt (Abschnitt 3.2.1). Als Kontrolle für eine unspezifische Färbung wurden nicht-transfizierte (mock) Zellen gleichermaßen behandelt (Negativkontrolle). Zur Markierung des HN-Proteins wurden die Zellen zunächst mit einem Primär-AK aus der Maus, der gegen das N-terminale Myc-Epitop gerichtet ist, inkubiert. Anschließend wurde der Primär-AK durch Inkubation der Zellen mit FITC- (Fluorescein isothiocyanate) markiertem anti-Maus Immunglobulin detektiert. Zum Schluss wurden die DG auf Objektträgern fixiert mittels *ProLong® Gold Antifade+DAPI*, welches zur Visualisierung der Zellkerne DAPI enthielt. Als Transfektionskontrolle wurde das Plasmid pCMV-myc-EGFP verwendet, das für das autofluoreszierende Protein EGFP (enhanced green fluorescent protein) kodiert. Mit diesem Plasmid transfizierte Zellen wurden 24 h nach der Transfektion ebenfalls mit Hilfe von PFA fixiert und anschließend ohne weitere Behandlung auf Objektträgern befestigt. Die Fluorophore wurden am kLSM 780 (konfokales Laser-Raster-Mikroskop) mit Licht einer Wellenlänge von 480 nm angeregt und mit Hilfe der Software ZEN2010 visualisiert (Abschnitt 3.2.1). Abbildung 7 A zeigt die erfolgreiche Expression des Kontrollplasmids pCMV-myc-EGFP. Etwa 20 % der Zellen zeigten eine deutliche Grünfärbung des Zytoplasmas und des Zellkerns. Die Transfektion war somit erfolgreich. Die nicht-transfizierten (mock) Zellen zeigten im Gegensatz dazu keine Fluoreszenz (Abbildung 7 B). Bei den Zellen, die mit den Mutation-enthaltenden Plasmiden transfiziert wurden (Abbildung 8) war eine intensive grüne Fluoreszenz im Zytosol, vermutlich im Bereich des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER) und des Golgi-Apparates zu beobachten. Die gleiche Fluoreszenzlokalisierung und -intensität wurde bei Zellen, transfiziert mit dem Ursprungsplasmid, sichtbar (Abbildung 8, HN-JL). Diese spezifische Grünfärbung zeigt die erfolgreiche Expression der mutierten HN-Proteine. In manchen Zellen, die die Mutanten Mut3 und Mut4 exprimierten, war neben der Färbung des rER und des Golgi-Apparates eine verstärkte Fluoreszenz neben dem Zellkern zu beobachten (Abbildung 9, weiße Pfeile).

Alle sechs Mutanten wurden erfolgreich hergestellt und ihre Expression mittels eines Immunfluoreszenz Assays nachgewiesen. Die sechs Konstrukte standen nun für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

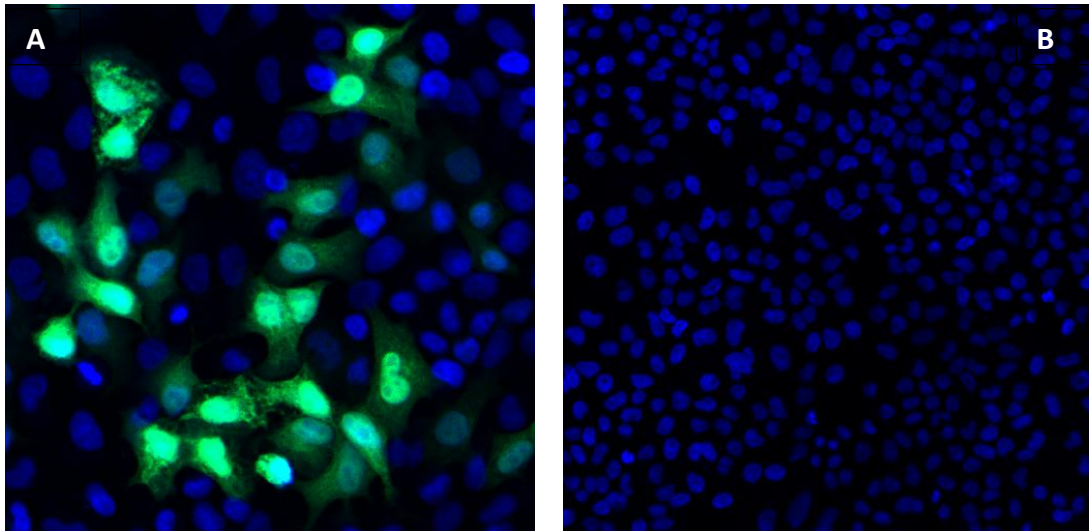


Abbildung 7: Kontrollen zur Transfektion der HEK293G Zellen.

HEK293G Zellen wurden auf DG in einer 24-Loch-Platte 24 h vor der Transfektion ausgesät und mit dem Plasmid pCMV-Myc-EGFP, das für das autofluoreszierende Protein EGFP kodiert, transfiziert (Transfektionskontrolle) (A). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert. Ohne weitere Behandlung wurden die DG auf Objektträgern mittels *ProLong® Gold Antifade + DAPI* fixiert, welches zur Visualisierung der Zellkerne DAPI (blau) enthält. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte (mock) Zellen ebenfalls mit PFA fixiert und die DG mittels *ProLong® Gold Antifade + DAPI* auf Objektträgern fixiert (B). Die Fluorophore wurden am kLSM 780 mit Licht angeregt und mit Hilfe der Software ZEN2010 visualisiert. Beide Kontrollen wurden mit 20 facher Vergrößerung aufgenommen und B im Aufnahmemodus „tilescan“.

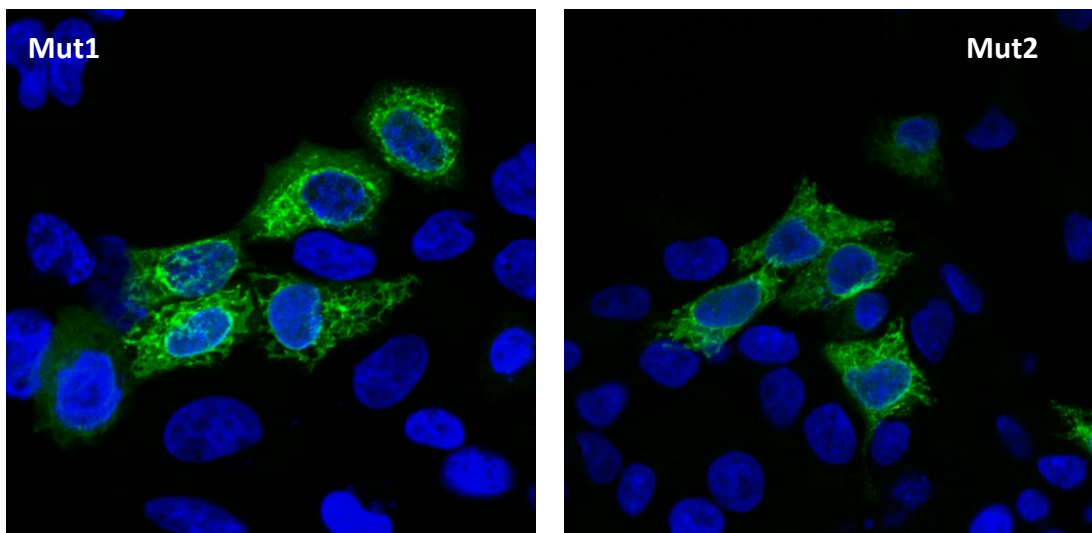


Abbildung 8: Nachweis der Expression der HN-Mutanten in transfizierten HEK293G Zellen.

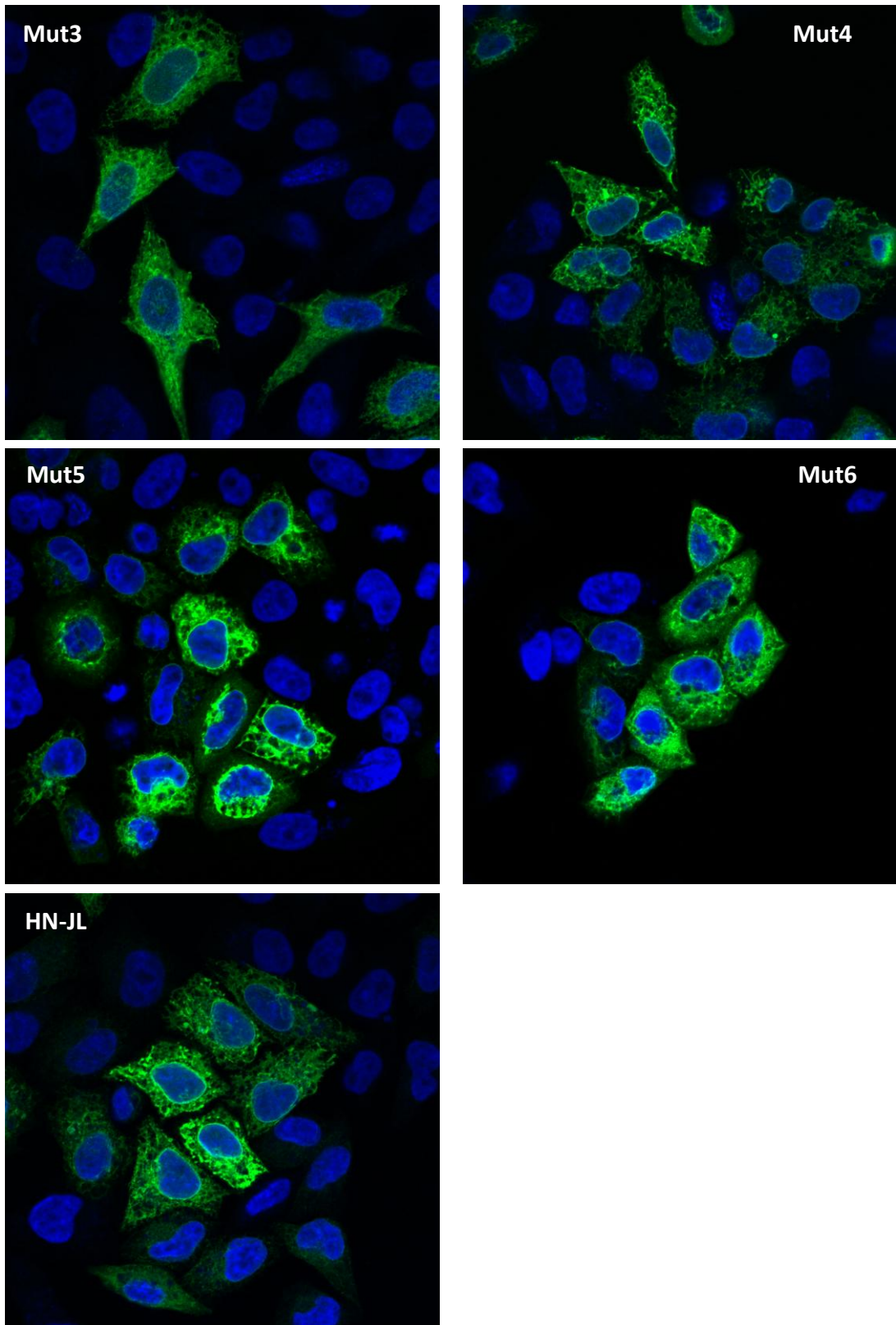


Abbildung 8: Nachweis der Expression der HN-Mutanten in transfizierten HEK293G Zellen.

Abbildung 8: Nachweis der Expression der HN-Mutanten in transfizierten HEK293G Zellen.

HEK293G Zellen wurden mit Plasmiden, die eine der sechs Mutationen enthalten, sowie dem Ursprungsplasmid (pCMV-Myc-HN-JL) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert, permeabilisiert und anschließend gefärbt. Zur Markierung des HN-Proteins wurden die Zellen zunächst mit einem Primär-AK aus der Maus, der gegen das N-terminale Myc-Epitop gerichtet ist, inkubiert. Anschließend wurde der Primär-AK durch Inkubation der Zellen mit FITC-markierten anti-Maus Immunglobulin detektiert. Die DG wurden mittels *ProLong® Gold Antifade + DAPI* auf Objektträgern fixiert, welches zur Visualisierung der Zellkerne DAPI enthält. Die Fluorophore wurden am kLSM 780 mit Licht angeregt und mit Hilfe der Software ZEN2010 visualisiert. Die Aufnahmen wurden in 63 facher Vergrößerung mit Öl aufgenommen.

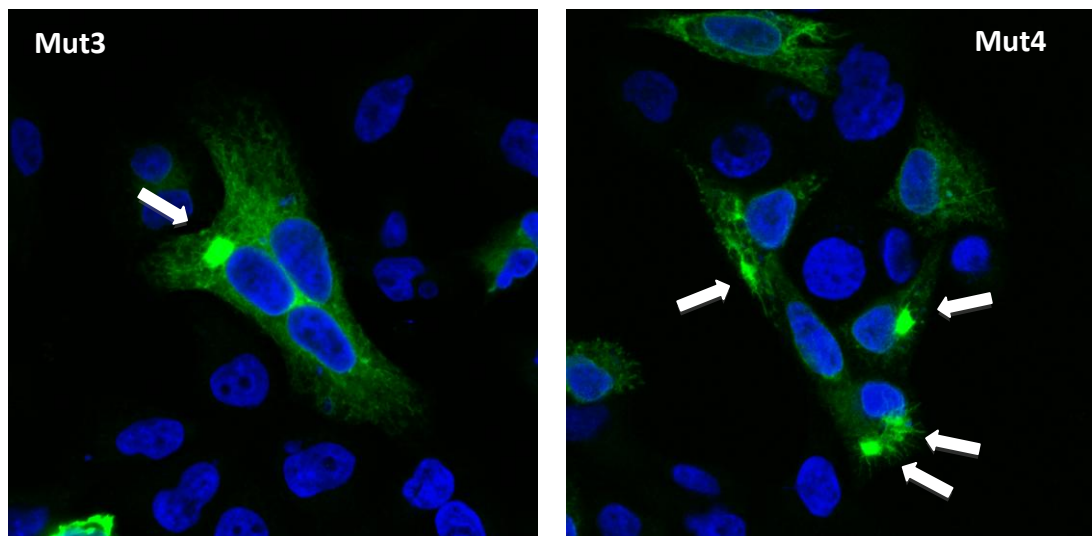


Abbildung 9: Besonderheiten bei der Proteinexpression der Mutanten Mut3 und Mut4 in transfizierten HEK293G Zellen.

HEK293G Zellen wurden mit dem Plasmid pCMV-Myc-HN-JL-Mut3 oder pCMV-Myc-HN-JL transfiziert und wie in Abbildung 8 beschrieben fixiert, permeabilisiert, gefärbt und mit dem kLSM 780 analysiert. Die Aufnahmen wurden in 63 facher Vergrößerung mit Öl aufgenommen. Die weißen Pfeile markieren verstärkte Fluoreszenzen neben dem Zellkern.

4.2 Etablierung der Versuchsbedingungen zur Untersuchung der neutralisierenden Kapazität von Patientenseren in der Immunfluoreszenz

Um die Bindungsfähigkeit von MuV AK gegenüber den in der Laborarbeit hergestellten Mutanten testen zu können, mussten zuerst Methoden zur Immunfluoreszenzfärbung mit Patientenseren etabliert werden.

Dafür wurden HEK293G Zellen auf DG in einer 24-Loch-Platte ausgesät und am darauffolgenden Tag mit dem Plasmid pCMV-Myc-HN-JL transfiziert (Abschnitt 3.1.2.1). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen, wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben, fixiert, permeabilisiert und abgesättigt. Für die anschließende Färbung wurde MuV IgG-positives Patientens Serum,

das vom Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Masern, Mumps, Röteln bereitgestellt wurde, in verschiedenen Konzentrationen (1:2, 1:10, 1:50, 1:100) direkt nach der Inkubation mit dem Blockpuffer I für eine Stunde zu den Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer I wurden die Zellen in 150 µl verdünnten (1:200) AK anti-Mensch Immunglobulinen aus der Ziege, die mit dem Fluorophor Alexa 488 gekoppelt waren, für 45 min bei RT im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Zur Färbung wurden drei verschiedene Patientenseren, die sich alle in der Höhe des IgG-Titers unterschieden, verwendet (Tabelle 3, Abschnitt 3.2.1). Die darauffolgenden Waschschrte, die DAPI-Färbung und Auswertung erfolgten wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Als Kontrolle für eine unspezifische Färbung wurden nicht-transfizierte (mock) Zellen gleichermaßen behandelt.

Wie Abbildung 10 zeigt, konnten bei der Auswertung am kLSM 780 keine spezifischen AK-Färbungen nachgewiesen werden. Transfizierte (HN-JL) und nicht-transfizierte (mock) Zellen zeigten eine ähnliche unspezifische Fluoreszenz des gesamten Zellrasens. Unterschiedliche IgG-Titer der Patientenseren resultierten mit steigender Konzentration zwar in höherer Intensität der Fluoreszenz, die Färbung blieb jedoch unspezifisch.

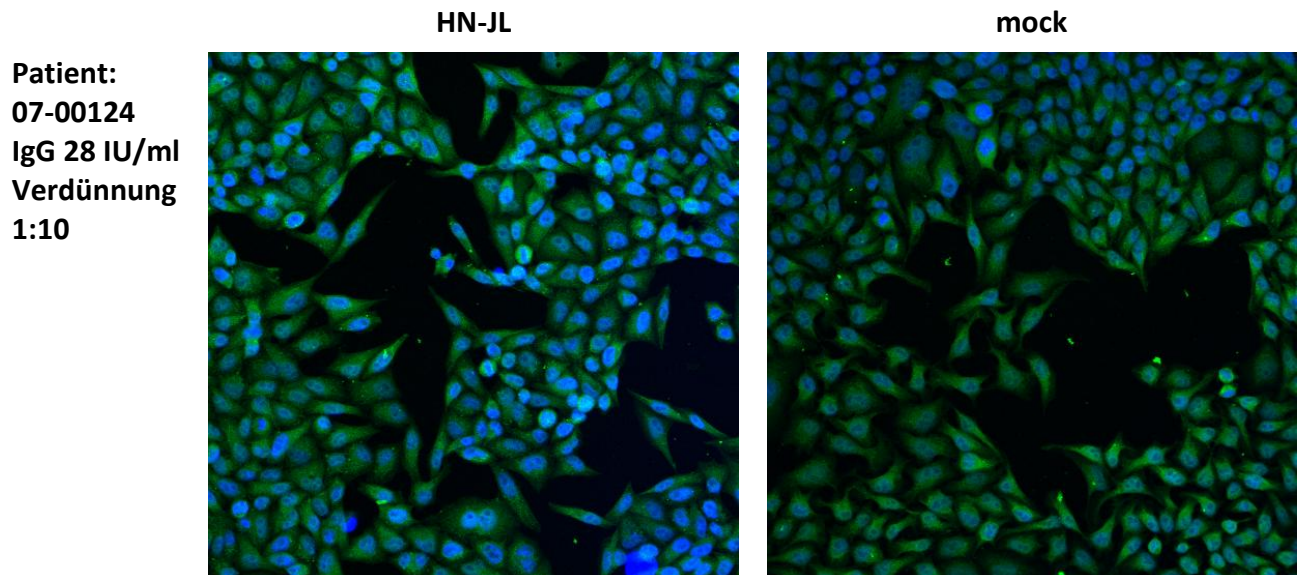


Abbildung 10: IFA mit Patientenserum bei transfizierten HEK293G Zellen.

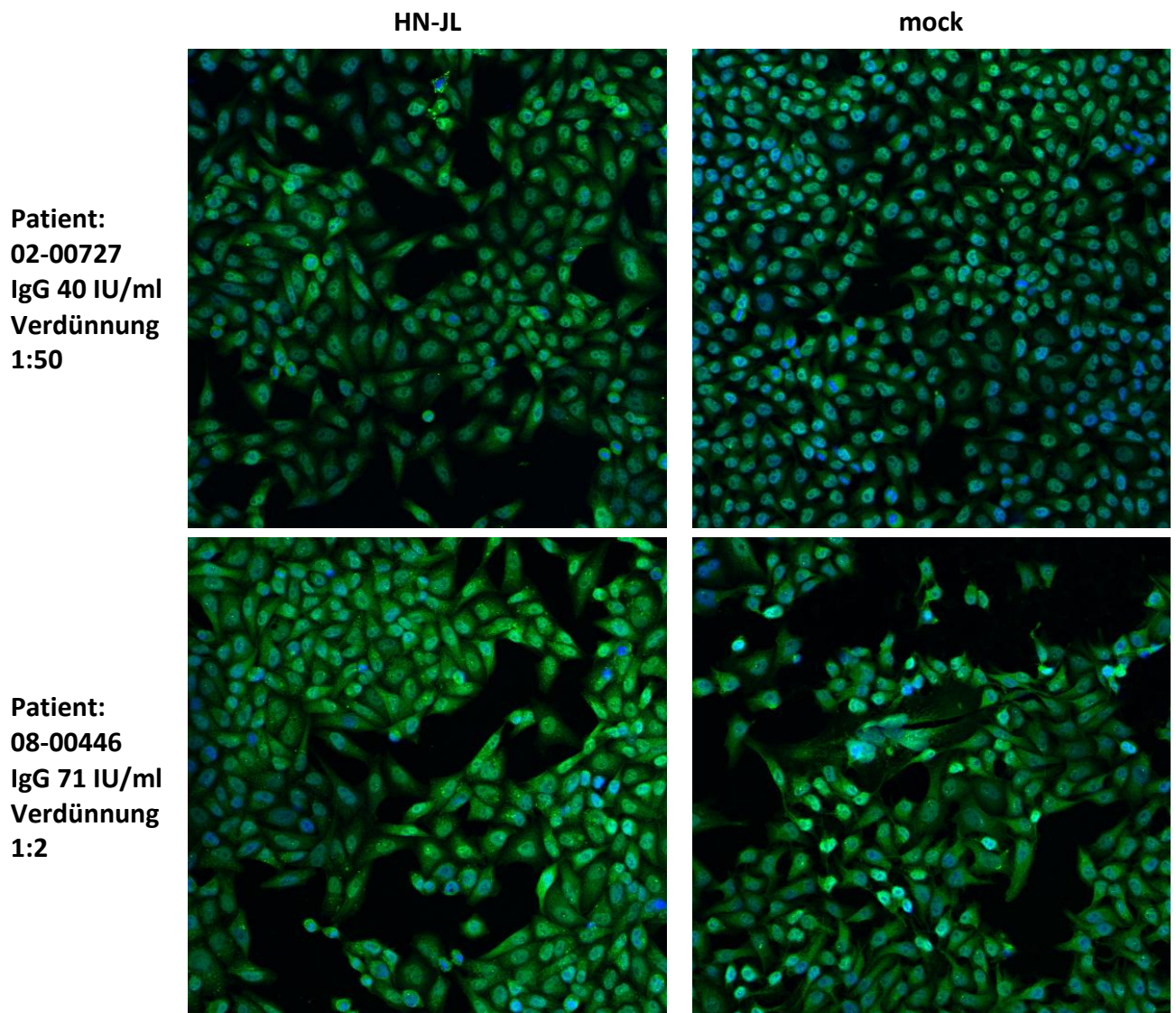


Abbildung 10: Immunfluoreszenz transfizierter HEK293G Zellen mit Patientenseren.

HEK293G Zellen wurden auf DG in einer 24-Loch-Platte 24 h vor der Transfektion ausgesät und mit dem Plasmid pCMV-Myc-HN-JL transfiziert, das für das HN-Protein kodiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Als Primär-AK wurde IgG-positives Patientens Serum mit unterschiedlichen Titern und in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Anschließend inkubierten die Zellen mit anti-Mensch Immunglobulinen aus der Ziege, die mit dem Fluorophor Alexa 488 gekoppelt waren. Die DG wurden auf Objektträgern mittels *ProLong® Gold Antifade + DAPI* fixiert, welches zur Visualisierung der Zellkerne DAPI (blau) enthielt. Die Analyse erfolgte mit dem kLSM 780 mit Hilfe der Software ZEN2010. Alle Aufnahmen wurden mit 20 facher Vergrößerung aufgenommen.

Um auszuschließen, dass die anti-Mensch Immunglobuline aus der Ziege für die unspezifische Färbung des gesamten Zellrasens verantwortlich sind, wurden diese titriert (1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000). Dies sollte unspezifische Bindungen reduzieren und spezifische fördern. Als primärer AK wurde das Patientens Serum 02-00727 verwendet. Alle anderen Schritte der Färbung erfolgten wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Als Kontrolle für eine unspezifische Färbung wurden nicht-transfizierte (mock) Zellen gleichermaßen behandelt.

Bei der Auswertung am kLSM 780 wurde bei keiner Sekundär-AK-Konzentration eine spezifische Färbung sichtbar (Abbildung 11). Transfizierte (HN-JL) und nicht-transfizierte (mock) Zellen zeigten ähnliche Fluoreszenzintensitäten. Mit abnehmender Konzentration des sekundären AK nahm auch die Fluoreszenzintensität ab. Bei einer Verdünnung von 1:2000 war keine Grünfärbung mehr sichtbar. Als weitere Kontrolle für eine unspezifische Färbung wurden nicht-transfizierte (mock) Zellen ohne vorherige Inkubation eines Primär-AK mit dem Sekundär-AK inkubiert. Dabei wurde keine Fluoreszenzfärbung sichtbar. Die unspezifische Hintergrundfärbung konnte demnach nicht durch Verdünnungen der anti-Mensch Immunglobuline aus der Ziege (Sekundär-AK) vermindert werden.

Zusätzlich zur Titrierung des Sekundär-AK wurden sowohl verkürzte Inkubationszeiten von 30 min des primären (Patient 02-01000) und sekundären AK als auch fünf Minuten lange Waschschrte mit dem Waschpuffer I auf dem Schüttler getestet. Dies sollte unspezifische Bindungen vermindern und Spezifische fördern. Die verlängerten Waschschrte sollten sicherstellen, dass nicht gebundene AK vollständig entfernt werden und die Hintergrundfärbung möglichst gering gehalten wird. Bei der Auswertung wurden die gleichen Ergebnisse, wie bei der Titrierung sichtbar (Abbildung 11). Die unspezifische Hintergrundfärbung konnte ebenso wie bei der Titrierung nicht durch verkürzte Inkubationszeiten des Primär- und Sekundär- AK oder längere Waschschrte vermindert werden.

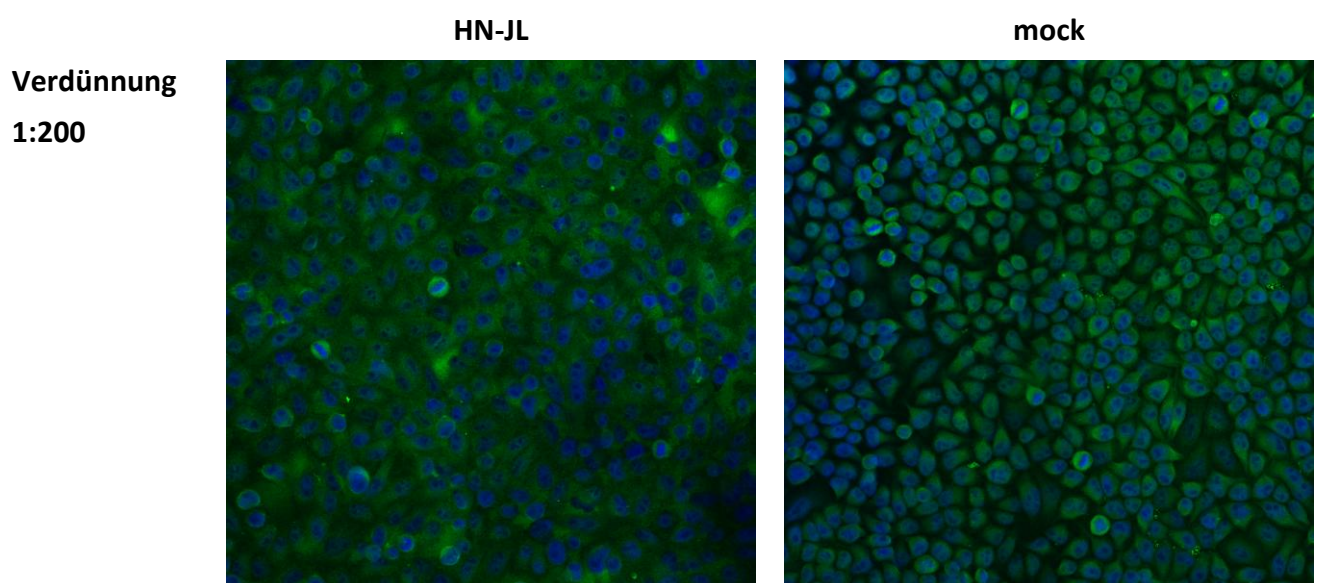


Abbildung 11: Titrierung des Sekundär-AK anti Mensch Immunglobulin aus der Ziege.

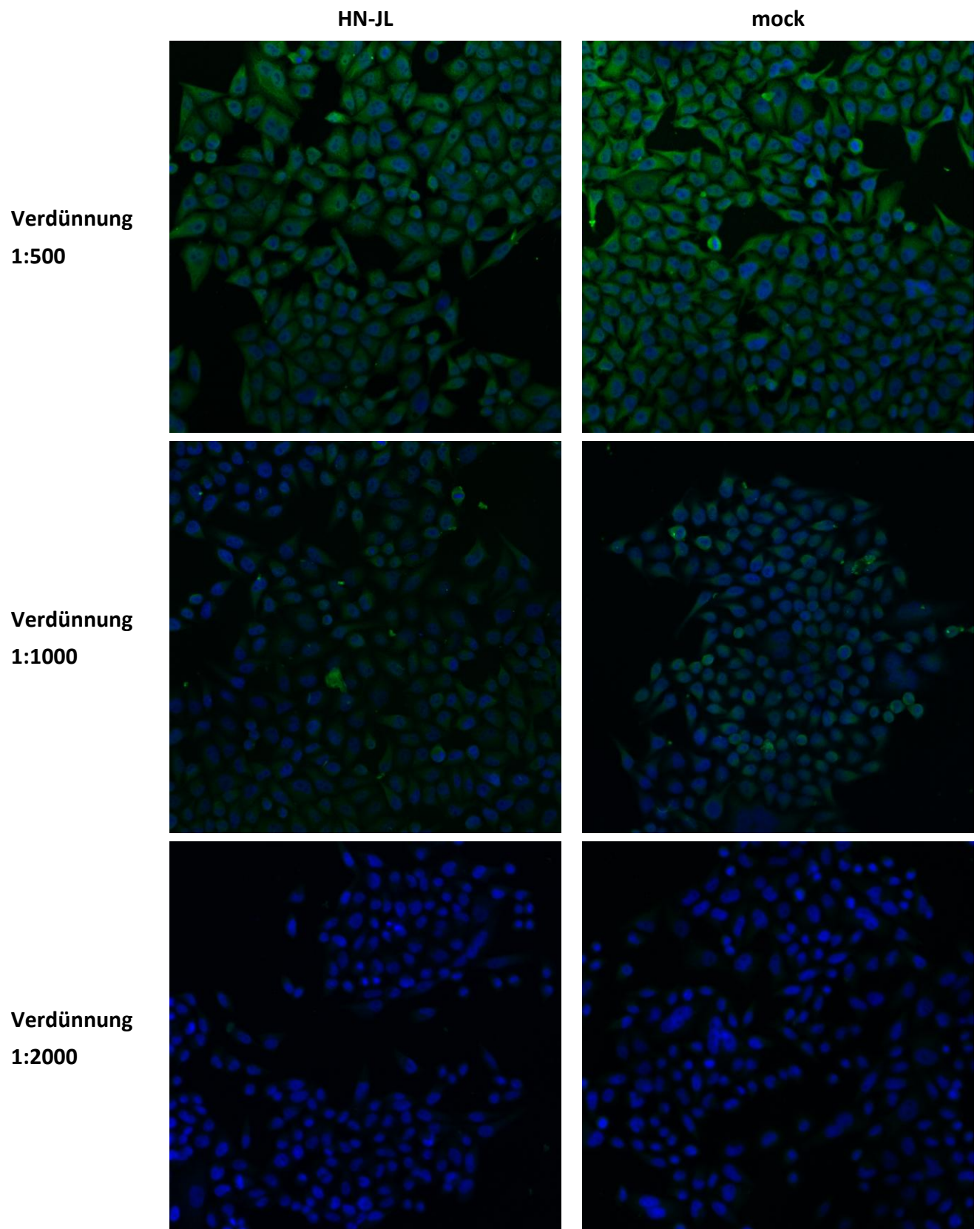


Abbildung 11: Titrierung des Sekundär-AK anti Mensch Immunglobulin aus der Ziege.

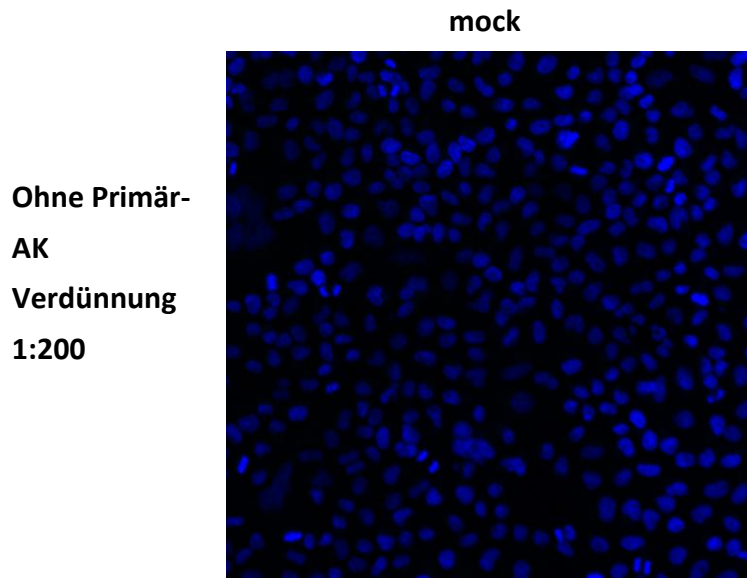


Abbildung 11: Titrierung des Sekundär-AK anti Mensch Immunglobulin aus der Ziege.

HEK293G Zellen wurden wie zu Abbildung 10 beschrieben ausgesät, transfiziert, fixiert, permeabilisiert, gefärbt und am kLSM 780 mit Hilfe der Software ZEN2010 analysiert. Für die Inkubation des Sekundär-AK (anti-Mensch Immunglobulin aus der Ziege, gekoppelt mit dem Fluorophor Alexa 488) wurden vier unterschiedliche Konzentrationen verwendet. Als weitere Kontrolle wurden nicht-transfizierte (mock) Zellen ohne vorherige Inkubation eines Primär-AK mit dem Sekundär-AK inkubiert. Alle Aufnahmen wurden mit 20 facher Vergrößerung aufgenommen.

Um auszuschließen, dass das Patientenserum andere Strukturen in der Zelllinie HEK293G, die von humanen Nierenzellen abstammt, erkennt, wurden ebenfalls transfizierte (HN-JL) und nicht-transfizierte (mock) Cos7 und Vero Zellen mit Patientenseren gefärbt. Die Zelllinien Cos7 und Vero stammen von Nierenzellen der Grünen Meerkatze ab. Zur Transfektion beider Zelllinien wurde das *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* verwendet (Abschnitt 3.1.2.2). Die Fixierung, Permeabilisierung, Färbung und Auswertung erfolgten wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Das Patientenserum (02-01000) wurde in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt.

Wie die HEK293G Zellen zeigten sowohl Cos7 als auch Vero Zellen unspezifische Fluoreszenzen des gesamten Zellrasens (Abbildung 12). Damit kann ausgeschlossen werden, dass unspezifische Fluoreszenzfärbungen auf die Erkennung humaner Strukturen der Zelllinie HEK293G durch das Patientenserum zurückzuführen sind.

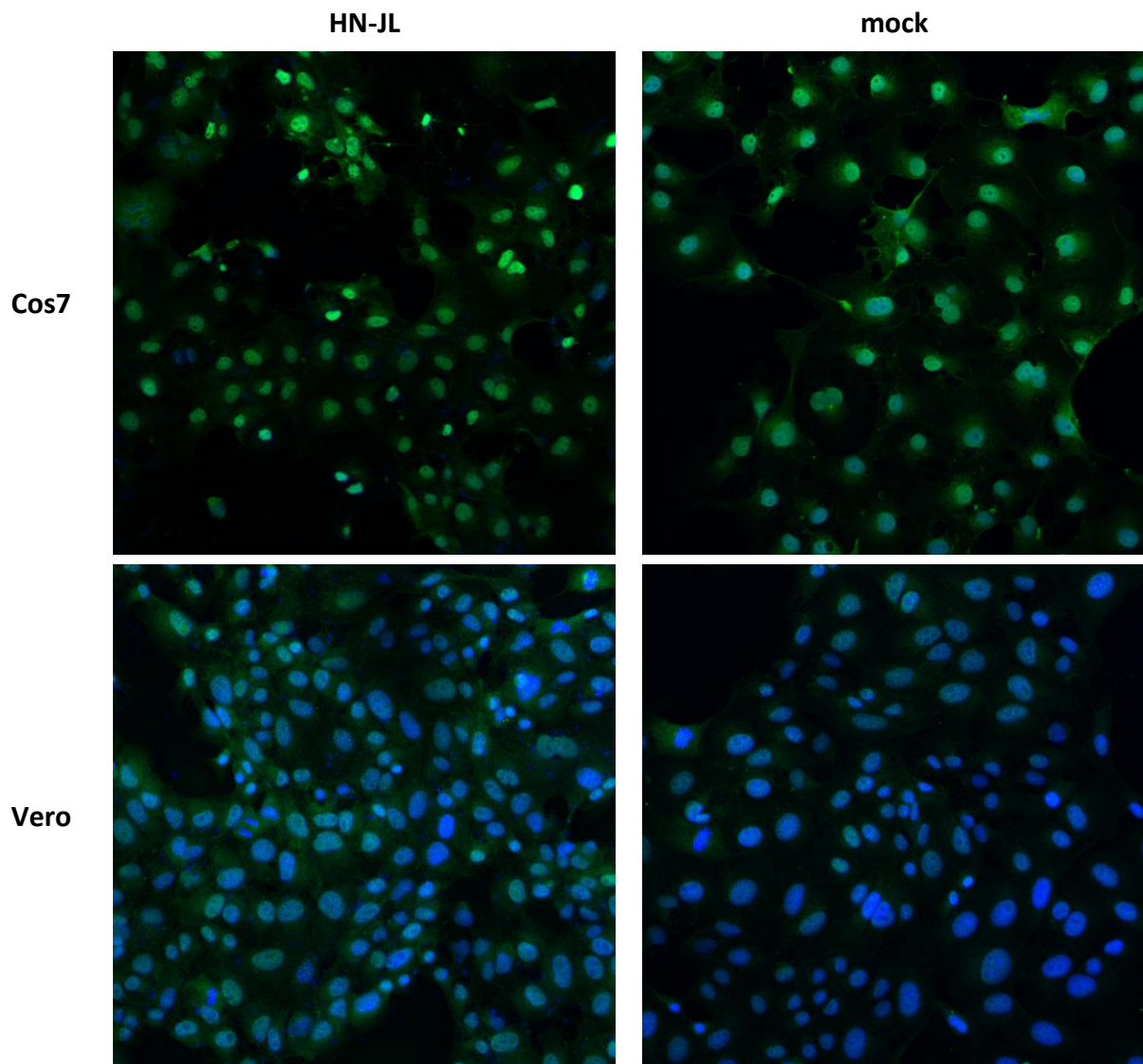


Abbildung 12: Immunfluoreszenz von Cos7 und Vero Zellen.

Cos7 und Vero Zellen wurden wie zu Abbildung 10 beschrieben ausgesät, transfiziert (HN-JL), fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Die Fixierung der DG auf den Objektträgern erfolgte mittels *ProLong® Gold Antifade + DAPI* und die Auswertung am kLSM 780 mit Hilfe der Software ZEN2010. Als Kontrolle für eine unspezifische Färbung wurden nicht-transfizierte (mock) Zellen gleichermaßen behandelt. Alle Aufnahmen wurden mit 20 facher Vergrößerung aufgenommen.

Aufgrund der unspezifischen Fluoreszenzfärbung der transfizierten (HN-JL) und nicht-transfizierten (mock) Zellen wurde angenommen, dass das IgG positive Patientenserum nicht nur an das HN-Protein bindet, sondern auch an weitere Strukturen der Zellen. Infolge dieser Beobachtung erfolgte eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit IgG-negativem Patientenserum. Die Inkubationszeiten wurden in zehnminütigen Intervallen bis zu einer Stunde getestet, um bestmögliche Absättigungsergebnisse zu erzielen. Des

Weiteren wurden auch unterschiedliche Verdünnungen (1:2, 1:10, 1:50) und verschiedene IgG-negative Patientenseren (13-00025 und 13-00241) eingesetzt.

Um zu verhindern, dass der Sekundär-AK Strukturen im IgG-negativem Patientens Serum erkennt und es erneut zu einer unspezifischen grünen Fluoreszenz des gesamten Zellrasens kommt, wurde während der Inkubation IgG-positives Patientens Serum mit Cy2-gekoppelten Fab-Fragmenten markiert. Pro DG wurden 20 µl des AK-Ansatzes mit einer Endverdünnung von 1:5 hergestellt (Abschnitt 3.2.1). Die darauffolgenden Waschschrirte, die DAPI-Färbung und Auswertung erfolgten wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Als Kontrolle für eine unspezifische Färbung wurden nicht-transfizierte (mock) Zellen gleichermaßen behandelt.

Wie in Abbildung 13 zu erkennen, zeigten alle Zellen unabhängig von der Verdünnung des Patientenserums oder der Zelllinie keine grüne Fluoreszenzfärbung. Gleiches wurde auch bei unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit IgG-negativem Patientens Serum beobachtet (Daten nicht gezeigt). Lediglich die Zellkerne waren bei allen Färbungen durch DAPI (blau) sichtbar. Eine Vorinkubation mit IgG-negativem Patientens Serum konnte demnach keine anschließende spezifische Fluoreszenz mit IgG-positivem Patientens Serum bewirken.

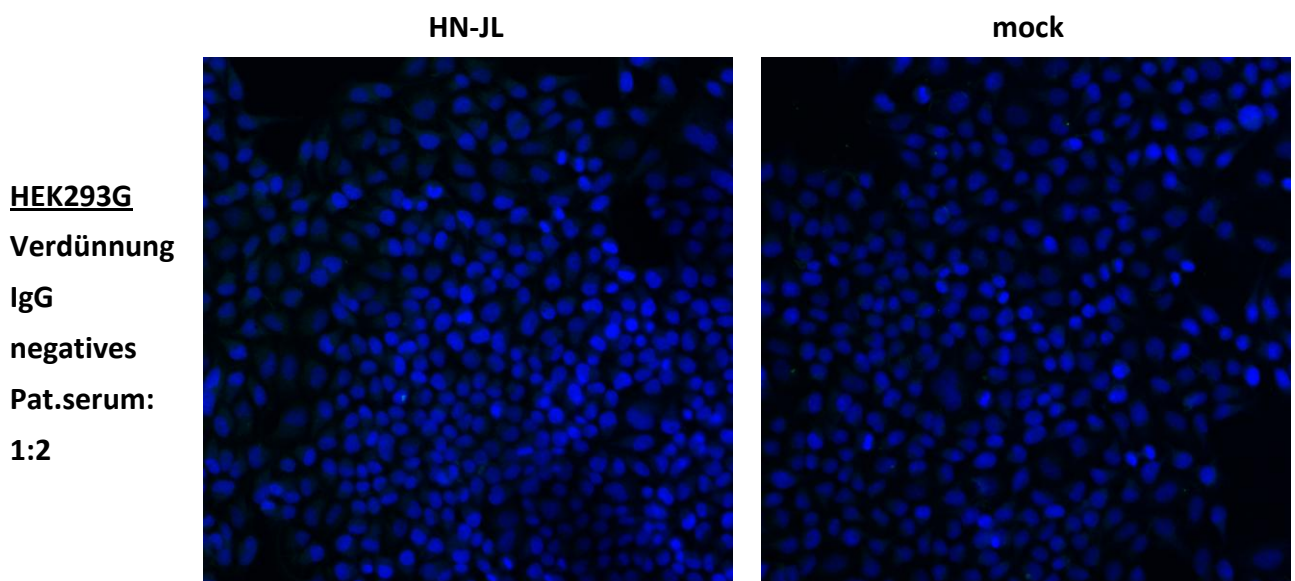


Abbildung 13: Immunfluoreszenz nach Vorinkubation mit IgG-negativem Patientens Serum.

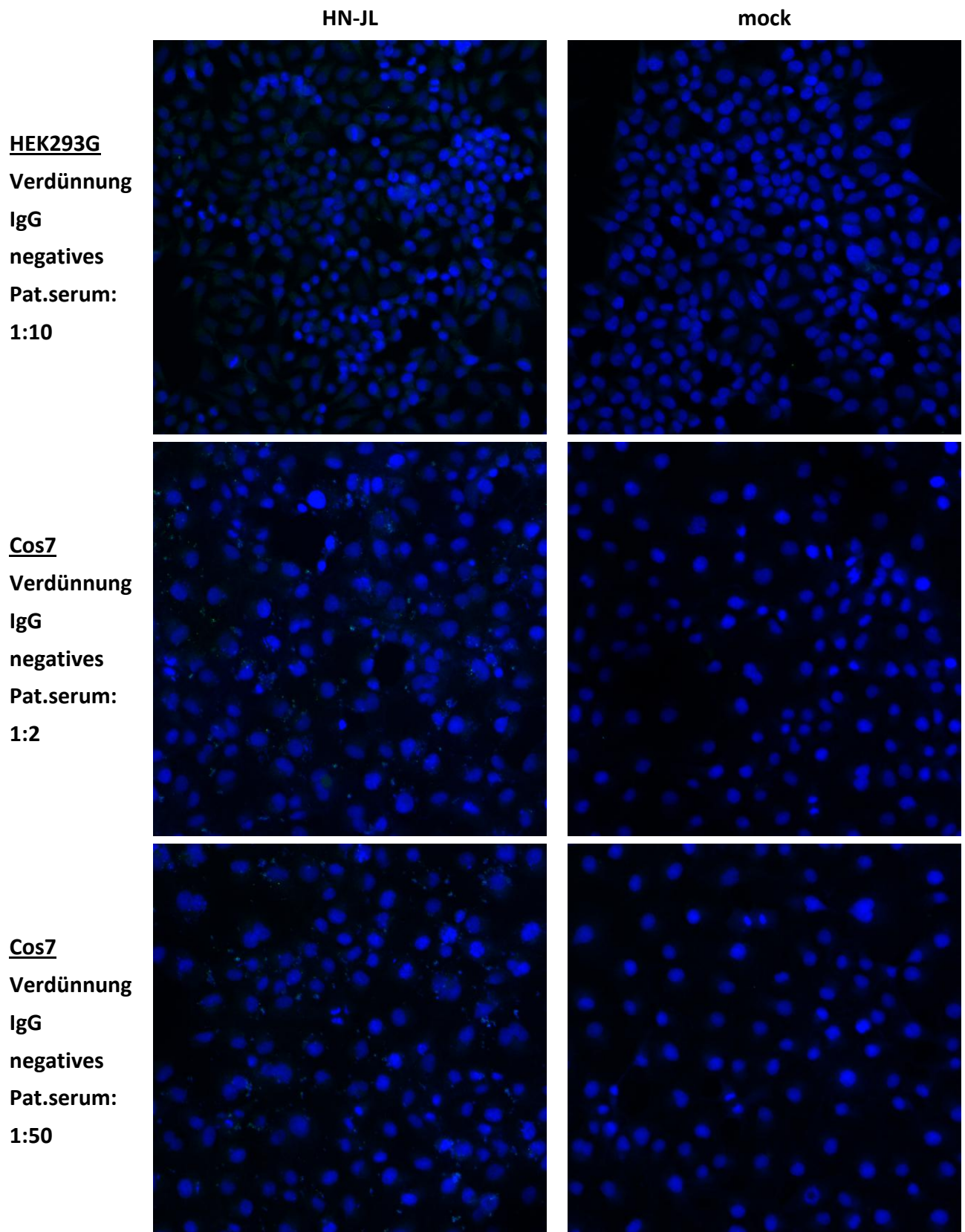


Abbildung 13: Immunfluoreszenz nach Vorinkubation mit IgG-negativem Patientenserum.

Abbildung 13: Immunfluoreszenz nach Vorinkubation mit IgG-negativem Patientenserum.

Cos7 und HEK293G Zellen wurden wie zu Abbildung 10 beschrieben ausgesät, transfiziert, fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte ein Absättigen unspezifischer Bindungen durch Inkubation mit IgG-negativem Patientenserum für eine Stunde. Für die Vorinkubation wurden unterschiedliche Verdünnungen (1:2, 1:10; 1:50) des Patientensersums eingesetzt. Während der Inkubation wurde das IgG-positive Patientenserum mit Cy2-gekoppelten Fab-Fragmenten markiert. Die Fixierung der DG auf den Objektträgern erfolgte mittels *ProLong® Gold Antifade + DAPI* und die Auswertung am kLSM 780 mit Hilfe der Software ZEN2010. Alle Aufnahmen wurden mit 20 facher Vergrößerung aufgenommen.

Weder eine Titrierung des Sekundär-AK noch die Verwendung verschiedener Zelllinien oder die Vorinkubation mit IgG-negativem Patientenserum konnten das HN-Protein erfolgreich in der Immunfluoreszenzanalyse nachweisen.

4.3 Nachweis von HN-Proteinen mittels monoklonaler MuV-AK in der Immunfluoreszenzanalyse

4.3.1 HN-Nachweis in transfizierten Zellen

Neben den Patientenseren sollten von C. Örvell (Schweden) bereitgestellte monoklonale AK, die gegen das MuV HN-Protein gerichtet sind, auf die Bindung gegenüber den hergestellten HN-Mutanten in der Immunfluoreszenz untersucht werden. Dazu wurde zunächst deren Affinität zum HN-Protein aus dem Ursprungsplasmid pCMV-Myc-HN-JL getestet. Transfizierte HEK293G Zellen wurden wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben gefärbt, wobei die von C. Örvell zur Verfügung gestellten monoklonalen AK aus der Maus als Primär-AK dienten. Daher wurde als sekundärer AK FITC-gekoppeltes anti-Maus IgG verwendet.

Abbildung 14 zeigt, dass lediglich bei Zellen, die mit AK 11 gefärbt wurden, eine geringe grüne Fluoreszenz beobachtet werden konnte. Alle anderen behandelten Zellen zeigten außer der DAPI-Färbung keine Fluoreszenz. Folglich konnte das HN-Protein in transfizierten Zellen mittels monoklonaler AK (C. Örvell) nicht nachgewiesen werden.

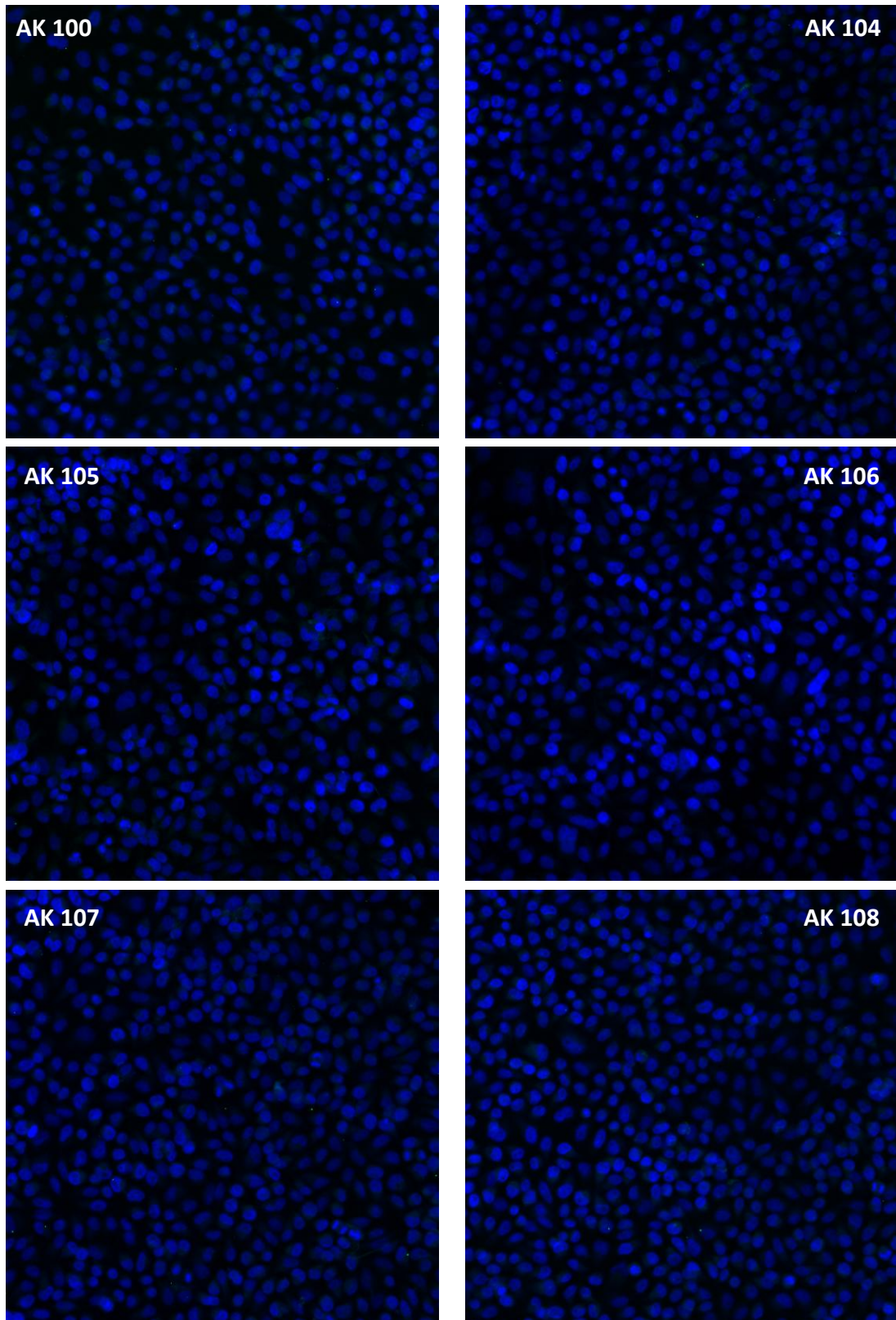


Abbildung 14: Nachweis des HN_{JL}-Proteins in der Immunfluoreszenzanalyse mittels monoklonaler Antikörper.

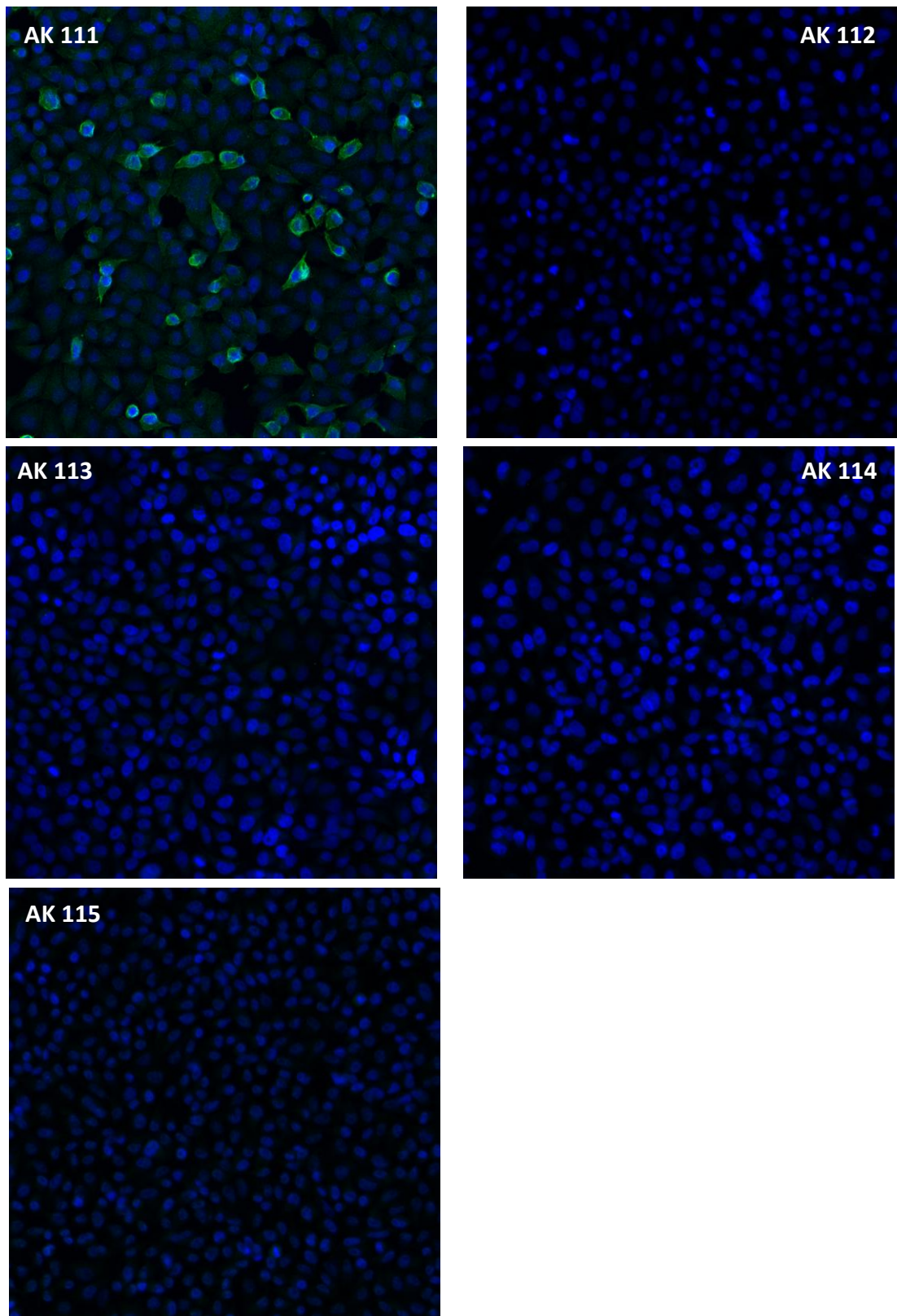


Abbildung 14: Nachweis des HN_{JL}-Proteins in der Immunfluoreszenzanalyse mittels monoklonaler Antikörper.

Abbildung 14: Nachweis des HN_{IL}-Proteins in der Immunfluoreszenzanalyse mittels monoklonaler Antikörper.

HEK293G Zellen wurden wie zu Abbildung 10 beschrieben, ausgesät und transfiziert. 24 h später wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Als Primär-AK wurden 11 von C. Örvell bereitgestellte monoklonale AK verwendet (AK 100, AK 104-108 und AK 11-115), die anschließend mit dem Sekundär-AK anti-Maus, gekoppelt mit dem Fluorophor FITC detektiert wurden. Die Fixierung der DG auf den Objektträgern erfolgte mittels *ProLong® Gold Antifade + DAPI* und die Auswertung am kLSM 780 mit Hilfe der Software ZEN2010. Alle Aufnahmen wurden mit 20 facher Vergrößerung aufgenommen.

4.3.2 Nachweis des HN-Proteins in infizierten Vero Zellen

Um zu testen, ob die 11 monoklonalen AK von C. Örvell das HN-Protein im viralen Kontext erkennen, wurden Vero Zellen mit dem MuV JL infiziert (MOI 0,02) oder als Kontrolle nicht behandelt (mock) (Abschnitt 3.1.3). Zum Nachweis der erfolgreichen Infektion wurde das N-Protein mit Hilfe eines N-Protein-spezifischen primären AK, der mit Cy3-gekoppelten Fab-Fragmenten markiert wurde, gefärbt (Abschnitt 3.2.1). Die Verdünnungen des anti-NP-AK sowie der Cy3 gekoppelten Fab-Fragmente sind Tabelle 3 und Tabelle 4 des Abschnitts 3.2.1 zu entnehmen.

In infizierten Zellen (Abbildung 15 A) war eine deutliche Rotfärbung des N-Proteins im Bereich der Synzytien (mehrkernige Riesenzellen), die Anzeichen einer MuV Virusinfektion sind, lokalisiert. In den nicht behandelten (mock) Zellen kam es weder zu einer Synzytienbildung noch zu einer Rotfärbung (Abbildung 15 B). Die erfolgreiche Infektion der Vero Zellen war somit bewiesen und eine unspezifische Färbung konnte ausgeschlossen werden.

Die Färbung mit Hilfe der monoklonalen AK von C. Örvell erfolgte analog zu der in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Färbung von transfizierten Zellen. Dabei zeigte sich, dass fünf der elf monoklonalen AK (100, 104, 105, 107, 111) das HN-Protein in infizierten Vero Zellen erkannten (Abbildung 16). Mit AK 115 markierte Zellen zeigten zwar ebenfalls eine Grünfärbung, jedoch war das Signal wesentlich schwächer im Vergleich zu den anderen fünf AK-gefärbten Zellen (Abbildung 16). Wie die NP-Färbung schien auch die HN-Färbung innerhalb der Synzytien lokalisiert. Um dies zu überprüfen wurde eine Doppelfärbung des N- und HN-Proteins durchgeführt. Die Färbung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst erfolgte die NP-Färbung mit Hilfe des Cy3-markierten NP-spezifischen AK und anschließend die Färbung des HN-Proteins mittels FITC-markiertem AK 111. Die Doppelfärbung zeigte eine Co-Lokalisation der Proteine HN und NP, was wiederum die erfolgreiche Infektion und die spezifische Färbung des HN-Proteins bestätigte.

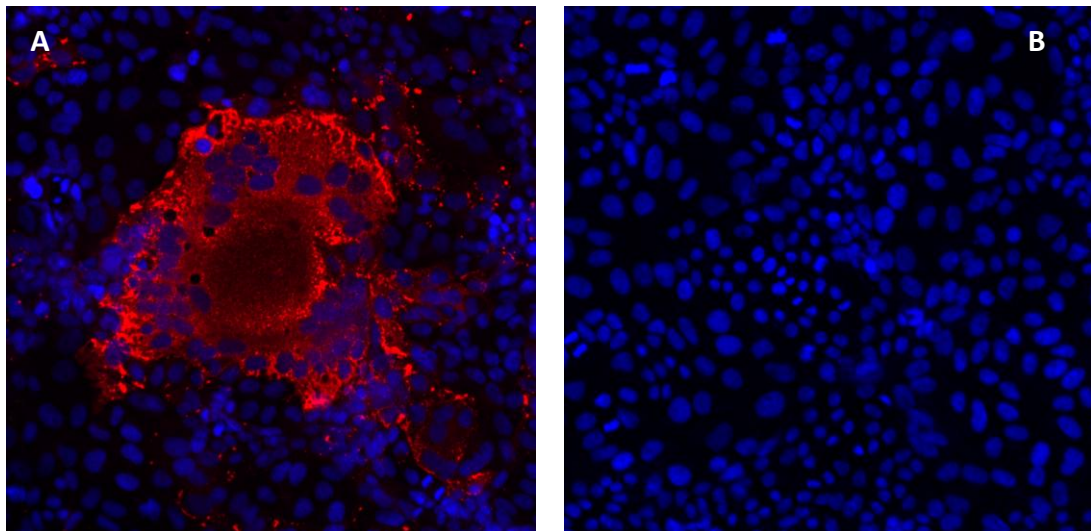


Abbildung 15: Kontrolle der Infektion von Vero Zellen mit dem MuV Jeryl Lynn (JL).

Vero Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit dem MuV JL mit einer MOI von 0,02 infiziert (A) und 48 h später wie zu Abbildung 10 fixiert und permeabilisiert. Die Färbung erfolgte durch Inkubation der Zellen mit einem NP-spezifischen Primär-AK, der mit Cy3-gekoppelten Fab-Fragmenten markiert war. Als Kontrolle wurden nicht-infizierte (mock) Zellen gleichermaßen behandelt (B). Anschließend wurden die Zellen mittels *ProLong® Gold Antifade + DAPI* auf Objektträgern fixiert. Die Analyse erfolgte am kLSM 780 mit Hilfe der Software ZEN2010. Beide Aufnahmen wurden mit 20 facher Vergrößerung aufgenommen.

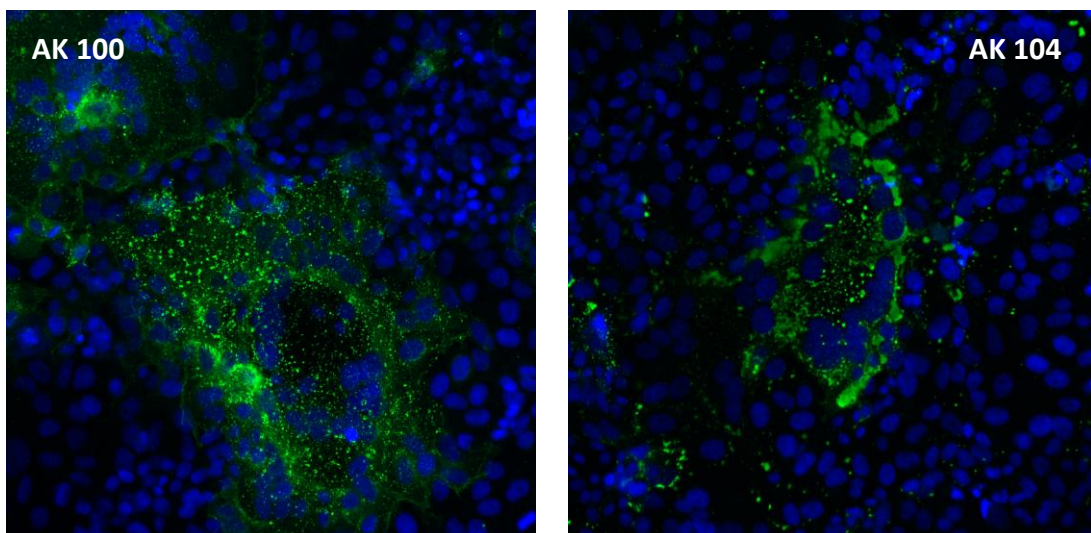


Abbildung 16: Nachweis des HN-Proteins in infizierten Vero Zellen mit Hilfe der monoklonalen AK von C. Örvell.

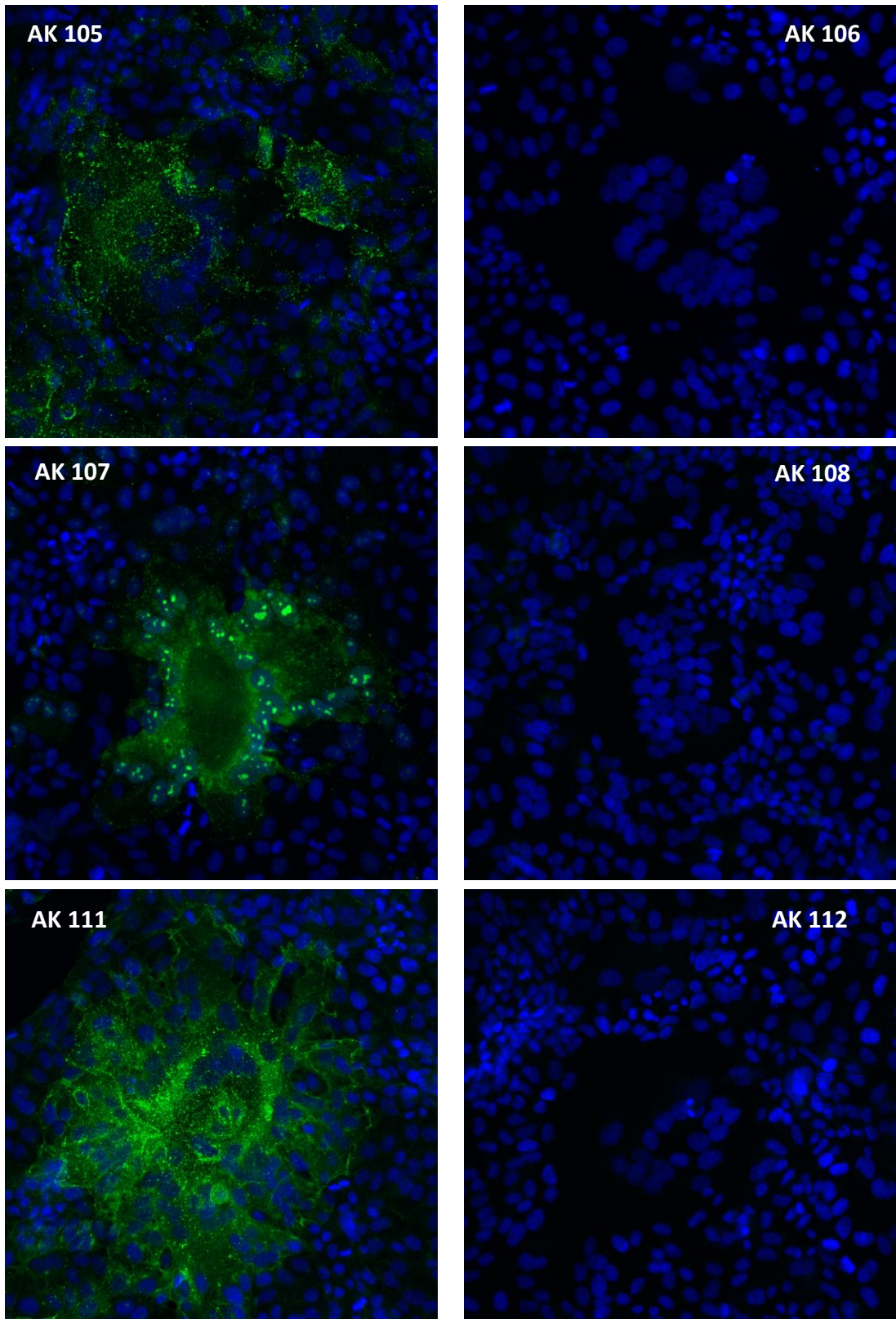


Abbildung 16: Nachweis des HN-Proteins in infizierten Vero Zellen mit Hilfe der monoklonalen AK von C. Örvell.

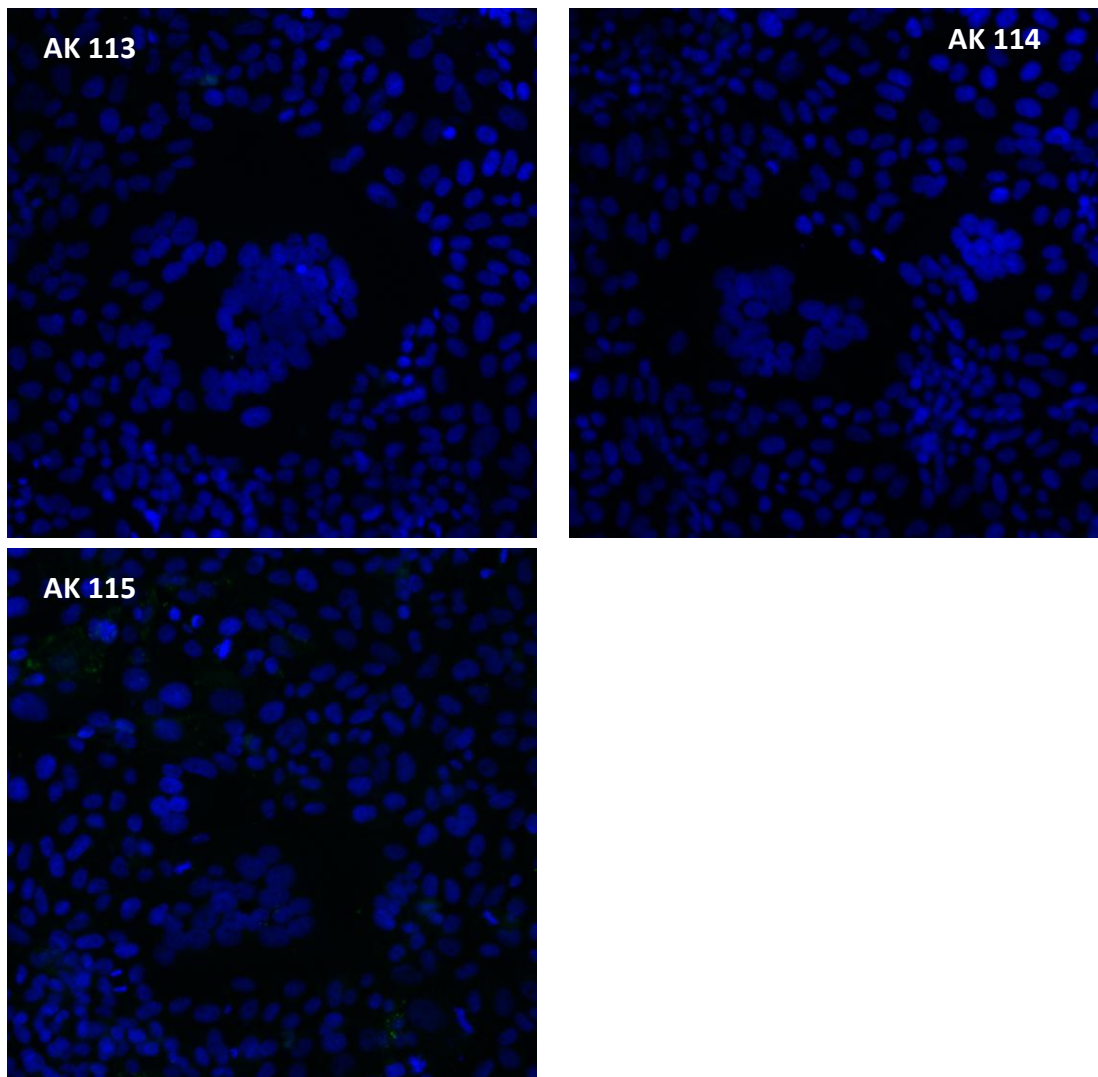


Abbildung 16: Nachweis des HN-Proteins in infizierten Vero Zellen mit Hilfe der monoklonalen AK von C. Örvell.

Vero Zellen wurden 24 h nach dem Aussähen mit dem MuV JL mit einer MOI von 0,02 infiziert und 48 h später wie zu Abbildung 10 beschrieben, fixiert und permeabilisiert. Für die Färbung wurden 11 von C. Örvell bereitgestellte monoklonale AK verwendet (AK 100, AK 104-108 und AK 11-115), die anschließend mit dem Sekundär-AK anti-Maus, gekoppelt mit dem Fluorophor FITC detektiert wurden. Abschließend wurden die Zellen mittels *ProLong® Gold Antifade + DAPI* auf Objektträgern fixiert. Die Auswertung erfolgte am kLSM 780 mit Hilfe der Software ZEN2010. Alle Aufnahmen wurden mit 20 facher Vergrößerung aufgenommen.

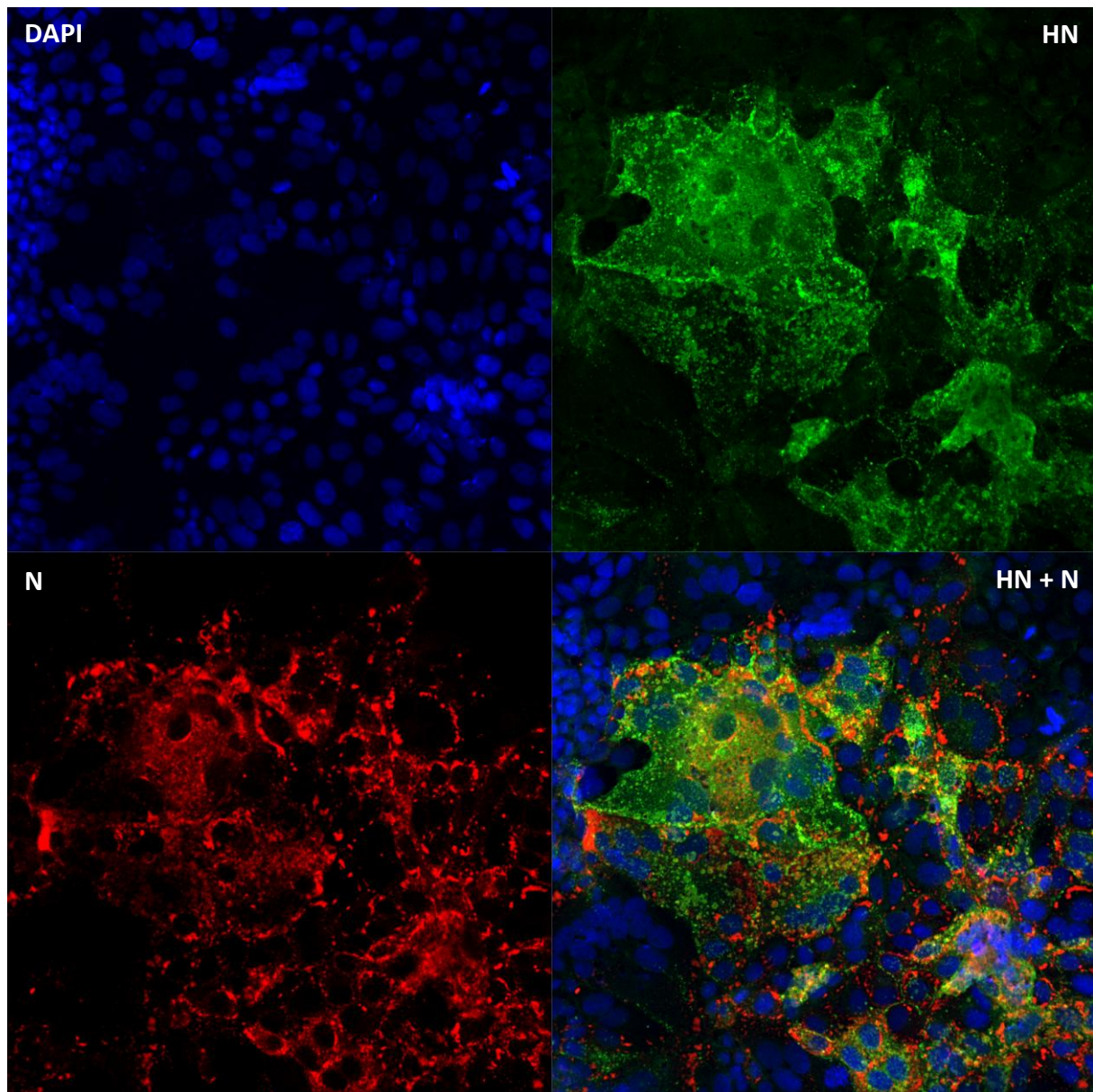


Abbildung 17: Nachweis des N- und HN-Proteins in infizierten Vero Zellen.

Vero Zellen wurden 24 h nach dem Aussähen mit dem MuV JL mit einer MOI von 0,02 infiziert und 48 h später wie zu Abbildung 10 beschrieben, fixiert und permeabilisiert. Die Färbung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde das N-Protein mit NP-spezifischen Primär-AK, die mit Cy3-gekoppelten Fab-Fragmenten markiert wurden, gefärbt. Im Anschluss erfolgte die Färbung des HN-Proteins mittels AK 111, der anschließend mit dem Sekundär-AK anti-Maus, gekoppelt mit dem Fluorophor FITC detektiert wurde. Abschließend wurden die Zellen mittels *ProLong® Gold Antifade + DAPI* auf Objektträgern fixiert. Die Auswertung erfolgte am kLSM 780 mit Hilfe der Software ZEN2010. Alle Aufnahmen wurden mit 20 facher Vergrößerung aufgenommen.

4.4 Nachweis des HN-Proteins in infizierten Zellen mit Hilfe von Patientenseren

Da HN im Viruskontext, aber nicht Plasmid-exprimiert durch monoklonale AK nachgewiesen werden konnte, war die Vermutung, dass auch Patientenseren HN nur im Viruskontext erkennen. Im Zusammenhang des viralen Kontextes wurde auch die Immunfluoreszenzfärbung nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit IgG-negativem Patientens Serum wiederholt (Abschnitt 4.2). Für die Inkubation mit IgG-negativem Patientens serum (13-00241) wurden erneut Inkubationszeiten von zehnminütigen Intervallen bis zu einer Stunde getestet. Das IgG-negative Serum wurde in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Während der Inkubation wurde IgG-positives Patientens serum (07-00542) mit Cy2-gekoppelten Fab-Fragmenten markiert. Pro DG wurden 20 µl des AK- Ansatzes unverdünnt hergestellt (Abschnitt 3.2.1). Die darauffolgenden Waschschrirte, die DAPI-Färbung und Auswertung erfolgten wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen, zeigten alle Zellen unabhängig von der Inkubationszeit keine grüne Fluoreszenzfärbung. Lediglich die Zellkerne waren durch DAPI (blau) sichtbar. Der virale Kontext konnte demnach nicht gewährleisten, dass HN durch Patientenseren erkannt wird.

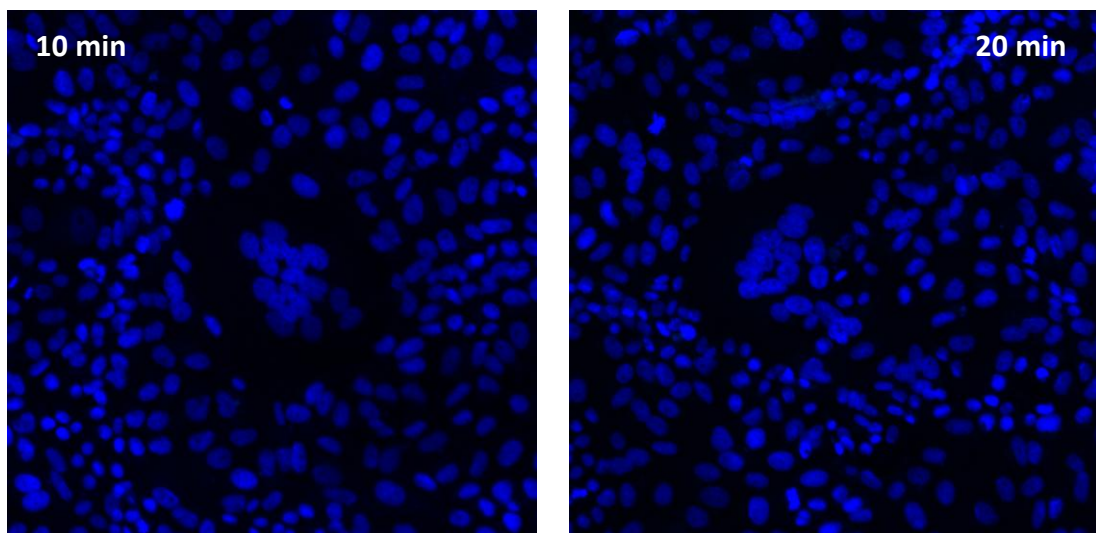


Abbildung 18: Immunfluoreszenz von infizierten Vero Zellen mit Patientenseren.

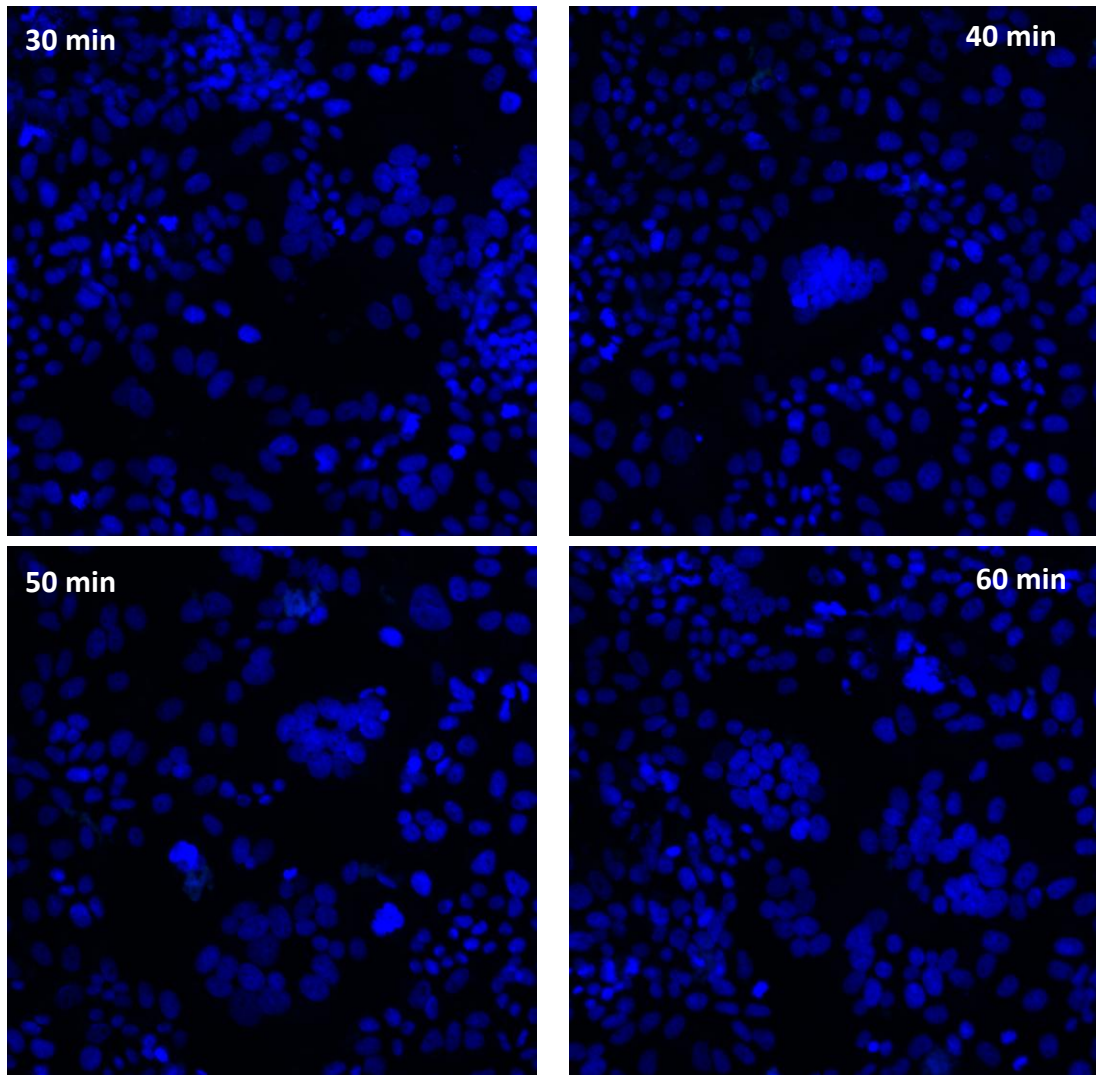


Abbildung 18: Immunfluoreszenz von infizierten Vero Zellen mit Patientenseren.

Vero Zellen wurden 24 h nach dem Aussähen mit dem MuV JL mit einer MOI von 0,02 infiziert und 48 h später wie zu Abbildung 10 beschrieben, fixiert und permeabilisiert. Vor der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte ein Absättigen unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit IgG-negativem Patientens Serum (1:10) für 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min oder 60 min. Anschließend wurde das HN-Protein mit Hilfe von IgG-positiven Patientens Serum (07-00542), das mit Cy2-gekoppelten Fab-Fragmenten markiert war, gefärbt. Abschließend wurden die Zellen mittels *ProLong® Gold Antifade + DAPI* auf Objektträgern fixiert. Die Auswertung erfolgte am kLSM 780 mit Hilfe der Software ZEN2010. Alle Aufnahmen wurden mit 20 facher Vergrößerung aufgenommen.

5 Diskussion

Das HN-Protein des MuV ist Hauptangriffsziel der humoralen Immunantwort und spielt eine entscheidende Rolle bei der Virusneutralisation. In den letzten Jahren häufig nachgewiesene Reinfektionen von geimpften oder natürlich immunisierten Menschen werfen die Frage auf, ob die Anzahlen der Impfdosen oder eine abnehmende Immunität im Laufe des Lebens verantwortlich für eine erneute Infektion sind. Studien vom Robert Koch-Institut konnten dies ausschließen [12]. Eine weitere Möglichkeit sind Mutationen innerhalb des HN-Proteins, die dafür sorgen, dass AK, die von dem menschlichen Immunsystem nach Impfung oder früherer Erkrankung gebildet wurden, nicht länger in der Lage sind, Epitope vom HN-Protein zu erkennen und zu neutralisieren. Demzufolge sollte die evolutionäre Veränderung der Epitope des MuV untersucht werden.

Um den Einfluss von Veränderungen des HN-Proteins auf die Bindungsfähigkeit und in weiteren Studien auf die neutralisierende Kapazität von AK untersuchen zu können, wurden in der vorausgegangenen Laborarbeit HN-Konstrukte mit AS-Mutationen hergestellt, die kürzlich aufgetretene Veränderungen des HN nachvollziehen. Dazu wurden AS-Sequenzen von HN-Proteinen von Impf- und Wildtypstämmen (insbesondere des aktuell zirkulierenden Genotyps G) miteinander verglichen. Es wurden Regionen in Wildtypstämmen erkennbar, die sich von Impfstämmen unterschieden, u. a. im Bereich bereits bekannter neutralisierender Epitope (352-360) oder in potentiell neutralisierenden Bereichen (113-130, 375-403 und 440-443) [1,49]. Insgesamt wurden mittels Mutagenese-PCR sechs Konstrukte hergestellt, die sich jeweils in einem Bereich der HN-Sequenz unterschieden. Es wurden fünf Mutanten in den potentiell neutralisierenden Bereichen konstruiert (Mut1 und Mut3 - 6) und eine Mutante, im von Kövamees *et al.* beschriebenen neutralisierenden Epitop 352-360 (Mut2). Die entsprechenden Mutationen wurden in das Plasmid pCMV-myc-HN-JL [61], das das Gen des HN-Proteins des Impfstammes JL mit einem N-terminalen Myc-Epitop enthält, eingebracht. Die Richtigkeit der mutierten Plasmide wurde mittels Sequenzierung nachgewiesen. Die Expression der HN-Protein-Mutanten wurde nach Transfektion von HEK293G Zellen mittels Immunfluoreszenz Assay (IFA) visualisiert. Dabei wurde ein AK verwendet, der das Myc-Epitop erkennt und mit dem der Nachweis aller Konstrukte möglich war. Bei allen HN-Mutanten war eine Fluoreszenz vermutlich im rER und im Golgi-Apparat nachweisbar. Zusätzlich trat bei einem Drittel der Zellen, die zur Expression der HN-Mutanten mit Mut3 (N399S, T402A, L403M) und Mut4 (S113A) transfiziert waren, verstärkte Fluoreszenzen in der Nähe der Zellkerne auf. Die Verteilung der anderen mutierten HN-Proteine entsprach der des HN-Proteins des Impfstammes JL, der beschriebene Effekt trat hier nicht auf. Eine mögliche Ursache für diese Besonderheit kann eine Fehlfaltung der Proteine aufgrund der eingeführten Mutationen sein. Diese lokal angereicherten,

fehlgefalteten Proteine können sich in sogenannten Aggresomen, nahe des Zellkerns ablagern [62], wenn Chaperone und Proteasomen nicht in der Lage sind falsch gefaltete Proteine in ihre korrekte Form zu bringen bzw. die fehlgebildeten Proteine abzubauen. Die fehlgefalteten Proteine werden dann zum Mikrotubuli bildenden Zentrum (MTOC = *microtubule organizing center*), nahe des Zellkerns, transportiert, und dort degradiert [63]. Faktoren wie Stress können ebenfalls die Bildung von Aggresomen auslösen. Große Aggresome können sich weiterhin spontan in >50 % der transfizierten Zellen bilden, wenn eine Transfektion mehr als 48 h zurückliegt [64]. Da jedoch alle Zellen zur selben Zeit transfiziert und auch danach stets gleich behandelt wurden, ist die Entstehung von Aggresomen hier vermutlich Folge der eingebrachten mutierten HN-Proteine. Möglicherweise beeinflussen die Mutationen die Faltung, sodass der intrazelluläre Transport der HN-Proteine gestoppt und diese so nicht zur Zelloberfläche gelangen, sondern zumindest teilweise in Aggresome transportiert werden. Eine leicht veränderte Faltung des HN-Proteins kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden und könnte die IgG-AK, die gegen das Impfvirus JL oder bei einer Erstinfektion gebildet wurden, daran hindern, Epitope des HN-Proteins zu erkennen und diese zu neutralisieren.

Um die Bindungsfähigkeit von MuV AK untersuchen zu können, sollten in der vorliegenden Arbeit Methoden zur Immunfluoreszenz mit Patientenseren etabliert werden. Dafür wurde nach Transfektion von HEK293G Zellen mit dem Ursprungsplasmid pCMV-Myc-HN-JL das HN-Protein mittels Patientenserum gefärbt. Die Färbung wurde mit drei Patientenseren, die sich alle in der Höhe des IgG-Titers unterschieden und mit jeweils unterschiedlichen Verdünnungen durchgeführt. Unabhängig vom IgG-Titer und der eingesetzten Konzentration wurden unspezifische Fluoreszenzen im gesamten Zellrasen sichtbar. Bei einer Titrierung des Sekundär-AK konnten spezifische Bindungen nicht gefördert oder unspezifische vermindert werden. Um auszuschließen, dass durch Patientenserum auch andere Bestandteile der Zelle gefärbt werden, wurden Vero und Cos7 Zellen, bei denen es sich um nicht-humane Zellen handelt, für weitere Immunfluoreszenzfärbungen verwendet. Auch hierbei wurden unspezifische Färbungen des gesamten Zellrasens sichtbar. Somit wurde vermutet, dass das IgG-positive Patientenserum nicht nur das HN-Protein in den Zellen erkennt, sondern unspezifisch an weitere zelluläre Strukturen bindet.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vor der Immunfluoreszenzfärbung mit IgG-negativem Patientenserum vorinkubiert, um Strukturen, die durch humane Seren erkannt werden, absättigen zu können. Dabei wurde jedoch keine Fluoreszenz außer der Zellkerne (DAPI) sichtbar. Um zu testen, ob die Methode zur Immunfluoreszenzfärbung fehlerhaft war, wurden 11 monoklonale AK (C. Örvell), die gegen das MuV HN-Protein gerichtet sind, für weitere Färbungen verwendet. Dabei zeigte nur der AK 111 eine geringe Immunfluoreszenz, bei allen anderen AK trat außer bei den Zellkernen keine Färbung auf. In späteren Versuchen

zeigte sich jedoch bei AK 111 eine starke Hintergrundfärbung, sodass auch hier vermutlich eine unspezifische Färbung vorlag.

Das Ausbleiben der Fluoreszenz bei transfizierten HEK293G Zellen durch Färbung mit Patientenserum oder monoklonalen AK kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein: eine falsche Faltung des HN-Proteins oder veränderte post-translationale Modifikationsmuster (z.B. Glykosylierungen). Die post-translationalen Modifikationen können selbst als Transportsignal dienen [65], oder können Interaktionen mit Lipid-Rafts (hochorganisierte Mikrodomänen in Zellmembranen) beeinflussen, die häufig als Signal zum Oberflächentransport (in polaren Zellen zur apikalen Domäne) dienen [66]. Ausbleibende Oberflächentransportsignale würden somit zum Nicht-Erkennen der eingesetzten AK und Ausbleiben der Fluoreszenz führen. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass die eingefügten Mutationen für fehlerhafte Faltungen oder veränderte post-translationale Modifikationen verantwortlich sind, da auch das nicht-mutierte HN Protein weder von Patientenseren noch monoklonalen AK erkannt werden konnte. In diesem Fall musste ein Fehler im Ursprungsplasmid vorliegen.

Eine weitere Möglichkeit für das Ausbleiben der Fluoreszenzfärbung transfizierter Zellen könnte im N-terminalen Myc-Epitop liegen. Dieses könnte die Faltung des HN-Proteins beeinflussen und dadurch die Erkennung durch AK, sowie den Oberflächentransport beeinträchtigen. Auch andere Arbeitsgruppen, die mit demselben Plasmid-Konstrukt arbeiten, gelang es bis jetzt nicht das HN-Protein erfolgreich nachweisen zu können (G. Herrler, persönliche Kommunikation). Dass durch das Anfügen des N-terminalen Myc-Epitops die Synthese von HN beeinflusst wird, kann hingegen ausgeschlossen werden, da die korrekte Länge von HN in früheren Western Blot Experimenten erfolgreich nachgewiesen wurde [67]. Beides, die korrekte Faltung und der Oberflächentransport, wurden in einem Fusionsassay untersucht. Dabei wurde das Myc-markierte HN und das F-Protein, das ebenfalls mit einem Myc-Epitop versehen war, koexprimiert. Nur wenn beide Proteine korrekt gefaltet sind, an die Zelloberfläche gelangen und miteinander interagieren, kommt es zur Bildung von Synzytien. Diese entstehen, wenn die Bindung von HN an zelluläre Rezeptoren eine Konformationsänderung induziert, wodurch hydrophobe Oberflächen von HN mit dem F-Protein interagieren, was wiederum die Fusion der Zytoplasmamembranen benachbarter Zellen zur Folge hat (Takimoto, Taylor et al. 2002). Jedoch blieb die Synzytienbildung bis 72 h nach der Transfektion aus. In früheren Studien stellte sich heraus, dass die Helferaktivität des HN-Proteins durch eine Mutation im ersten oder sechsten β -Faltblatt des Proteins vermindert werden kann [68]. Das N-terminale Myc-Epitop könnte durch das Beeinflussen der Faltung von HN auf ähnliche Weise eine Fusion verhindern. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass Myc-markierte F-Proteine nicht post-translational modifiziert und aufgrund des Myc-Epitops fehlgefaltet werden und dadurch nicht funktionell sind.

Weitere Studien zeigten, dass nur transfizierte Zellen fusionieren können, wenn beide Proteine (F und HN) vom gleichen oder nah verwandten Virus abstammen [68,69]. Diese Fehlerquelle kann ausgeschlossen werden, da beide verwendeten Plasmide auf Basis des MuV JL hergestellt wurden [67]. Des Weiteren kann die Zelllinie HEK293G für einen Fusionsassay ungeeignet sein, da schon in früheren Versuchen innerhalb der Arbeitsgruppe beobachtet wurde, dass sich diese Zelllinie schlecht infizieren lässt und nur wenige Synzytien bildet. Ein Grund dafür könnte die Lipidzusammensetzung der HEK293G Zellen sein, die für Synzytienbildungen bei Infektionen kritisch zu sein scheint [70]. Demnach muss im weiteren Verlauf die Funktionalität der Plasmide überprüft werden. Dafür kann beispielsweise durch Nicht-Permeabilisierung der Zellen vor der Fluoreszenzfärbung der Oberflächentransport überprüft werden. Gegen die Tatsache, dass sowohl die humanen als auch die AK von C. Örvell aufgrund von fehlender Präsentation an der Zelloberfläche nicht an das HN-Protein binden konnten, spricht jedoch die Tatsache, dass alle Zellen vor der Färbung mit Triton X-100 permeabilisiert wurden. Somit waren auch intrazelluläre HN-Proteine für die AK erreichbar.

Ein anderer Grund für das Ausbleiben von Fluoreszenzen könnte der fehlende Viruskontext sein. Es ist bekannt, dass das Matrix-Protein (M-Protein), das Nukleokapsid-Protein (N-Protein) [71], sowie das *Small Hydrophobic*-Protein (SH-Protein) mit HN interagieren und das SH-Protein dadurch vermutlich zur Stabilisierung des HN-Proteins beiträgt [67]. Um festzustellen, ob die Immunfluoreszenz aufgrund des verwendeten Plasmids pCMV-Myc-HN-JL ausblieb, wurden für alle weiteren Färbungen Vero Zellen verwendet, die mit dem MuV (JL) infiziert wurden. Die wiederholte Immunfluoreszenz mit infizierten Vero Zellen und den 11 monoklonalen AK, ergab bei fünf AK (100, 104, 105, 107 und 111) eine spezifische Fluoreszenz. Somit kann vermutet werden, dass die Immunfluoreszenz in transfizierten Zellen aufgrund des verwendeten Plasmids erfolglos blieb.

Die Tatsache, dass nur fünf der elf AK (C. Örvell) HN spezifisch in infizierten Zellen erkannten, kann am MuV Stamm JL liegen. C. Örvell *et al.* erwähnten nicht, welcher MuV Stamm zur Herstellung der monoklonalen AK verwendet wurde [50] und bei Untersuchungen (ELISA) hinsichtlich der antigenischen Bindestelle der AK konnte gezeigt werden, dass nicht alle AK mit allen MuV Stämmen reagierten, wobei allerdings nicht der JL Stamm getestet wurde [50]. Zusätzlich können Transport und Alter der AK Grund für ausbleibende Fluoreszenzen sein.

Nach der erfolgreichen Immunfluoreszenz mit monoklonalen AK, wurde das Anfärben mit Patientenserum unter den bereits etablierten Bedingungen wiederholt. Dafür wurden ebenfalls mit dem MuV JL infizierte Vero Zellen verwendet. Wie auch bei den transfizierten Zellen trat keine grüne Fluoreszenz auf.

Dieses Ergebnis war unerwartet, da die indirekte Immunfluoreszenz eine in der Diagnostik häufig angewandte Methode ist. Als mögliche Ursachen können angesehen werden, dass durch die Vorinkubation mit Mumpsvirus IgG-negativem Patientenserum es zu einer sterischen Hinderung bezüglich des Mumpsvirus IgG-positiven Patientensersums kam, da auch bei Einsatz wenig verdünnter Seren keine grüne Fluoreszenz auftrat. In weiteren Versuchen wurden daher Immunfluoreszenzuntersuchungen mit höher verdünnten Seren durchgeführt. Für die verwendeten Patientenseren war im Nationalen Referenzzentrums (NRZ) für Masern, Mumps, Röteln der IgG-Titer durch einen ELISA-Test bestimmt worden, dieses Testverfahren beruht ebenfalls auf dem Prinzip der Antigen-AK-Bindung. Beim ELISA werden Virus-Antigene auf einer Kunststoffplatte präsentiert, an die im Patientenserum befindliche spezifische AK binden können. Wie bei der Immunfluoreszenz wird die Bindung durch einen Sekundär-AK und einer nachfolgenden Farbreaktion nachgewiesen [72].

Eine weitere mögliche Ursache für das negative Fluoreszenzergebnis wäre, dass die in den Patientenseren vorhandenen AK das HN-Protein des JL Virus nicht erkennen. Die Immunantwort der Patienten wurde nach einer durchgestandenen Erkrankung oder einer Impfung gebildet, wobei der Genotyp nicht bekannt ist. Wie bereits erwähnt, kam es in den letzten Jahren vermehrt zu MuV Ausbrüchen bei Geimpften in Ländern Nordamerikas und Europas, obwohl einer Vakzin-Wirksamkeit von 91-94,6 % nach einer Zwei-Dosen Impfung belegt ist [73]. Auch frühere Studien konnten zeigen, dass monoklonal gebildete AK keine Garantie für einen Schutz sind und dass verschiedene MuV Stämme verschiedene antigenische aufweisen. So konnten Serum-Proben homologe, aber nicht alle heterologen Wildtyp-MuV neutralisieren [19,24,51,74,75]. Um mit Sicherheit eine MuV Erkrankung zu diagnostizieren, wird daher empfohlen eine PCR durchzuführen, da es bei anderer serologischer Diagnostik zu einer Untererfassung kommen kann. Es ist also denkbar, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Seren die Proteinstrukturen des HN-Proteins des möglicherweise heterologen Stammes JL nicht erkennen, da sie im Vorfeld aufgrund eines anderen Genotyps entstanden sind. In der Diagnostik werden meistens ELISA- und Neutralisationstests (NT) angewendet, um eine MuV Infektion nachzuweisen. Bei einem NT, auch Plaque-Reduktions-Assay genannt, wird das Patientenserum mit einer Virussuspension gemischt. Ist das Serum positiv, binden die AK an das Virus und inaktivieren es. Bei Zugabe des Gemisches zur Zellkultur erfolgt keine Infektion und der CPE (zytopatischer Effekt) bleibt aus. Es ist bekannt, dass ein im ELISA positives Ergebnis nicht mit einem NT-Ergebnis korreliert. [76]. Aus der hier vorgelegten Arbeit kann der Rückschluss gezogen werden, dass die Ergebnisse eines ELISA nicht mit denen eines IFA korrelieren. Auch Matsubara *et al.* zeigten in einer Studie hinsichtlich des Nachweises der MuV Proteine N, F und HN, dass viele Seren trotz hoher Titer im ELISA im IFA negativ gegenüber den Proteinen F und HN waren. Im Gegensatz dazu waren

alle Seren, die positiv gegen F und HN im NT waren, auch positiv im IFA [76]. Die Ergebnisse eines NT scheinen mit denen eines IFA zu korrelieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich das HN-Protein mit Hilfe fünf monoklonaler AK (C. Örvell), nachgewiesen werden, welche nun in weiteren Versuchen eingesetzt werden können. Es wurde gezeigt, dass ein ELISA positives Ergebnis nicht mit einem IFA Ergebnis korreliert. Dies ist eine entscheidende Beobachtung, dem in weiteren Untersuchungen zum Nachweis einer MuV Erkrankung in der serologischen Diagnostik nachgegangen werden muss.

Für die weitere Verwendung von Plasmid-Konstrukten mit den Proteinen HN oder F war es von enormer Wichtigkeit festzustellen, dass trotz einer vollständigen Synthese (positives Western Blot Ergebnis) die exprimierten Proteine in der IFA vermutlich nicht nachzuweisen sind. Auf diesem Ergebnis kann nun aber für weitere Versuchsplanungen aufgebaut werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Mumpsvirus (MuV) gehört der Familie der *Paramyxoviridea* an und besitzt ein Genom aus einer einzelsträngigen, nicht-segmentierten, negativ-orientierten RNA. Das Genom kodiert für insgesamt neun Proteine. Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf dem HN-Protein, gegen das während einer Infektion neutralisierende AK gebildet werden und das somit, eine wichtige Rolle bei der Virusinfektion und dem Aufbau der Immunität hat.

In den letzten Jahren kam es häufig zu MuV Ausbrüchen bei geimpften oder durch Erkrankung immunisierten Menschen, die eigentlich gegen eine erneute Erkrankung geschützt sein müssten. Die Erkrankungen erfolgten fast ausschließlich durch Viren des Genotyps G, während der in vielen Impfungen verwendete Stamm Jeryl Lynn (JL) dem Genotyp A angehört. Folglich wird diskutiert, ob die durch die derzeit verwendeten Impfstoffe gegen das MuV Protein HN gebildeten AK einen lebenslangen Schutz vor Infektion mit dem Genotyp G bieten können. Studien vom Robert Koch-Institut konnten ausschließen, dass eine natürlich abnehmende Immunität für eine Reinfektion verantwortlich ist oder, dass zusätzliche Impfungen vor einer Infektion schützen können.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Mutationen im HN-Protein auf die Bindungsfähigkeit von MuV AK analysiert werden, die bei aktuell zirkulierenden Wildviren des Genotyps G festgestellt worden waren. Für diese Untersuchungen wurden in der vorherigen Laborarbeit sechs Konstrukte hergestellt, basierend auf AS-Sequenz-Vergleichen von Impf- und Wildtypstämmen. Dabei wurden Mutationen in bereits bekannten und in potentiell neutralisierenden Epitopen identifiziert und diese gezielt in das HN-Protein des Impfstammes Jeryl Lynn (JL) eingebracht.

Als Nachweisverfahren zur Erkennung und Bindung von AK an das HN-Protein wurde der Immunfluoreszenz Assay (IFA) gewählt. Dafür war es notwendig, zuerst die Versuchsbedingungen für eine Färbung mit Patientenseren zu etablieren. Dabei wurde sichtbar, dass sich nach Transfektion mit Plasmiden zur Expression des HN das Protein nicht mit Patientenseren oder monoklonalen AK, bereitgestellt von C. Örvell, nachweisen ließ. Diesem Befund musste nachgegangen werden. Um festzustellen, ob die Immunfluoreszenz aufgrund des verwendeten Plasmids pCMV-Myc-HN-JL ausblieb, wurden MuV infizierte Vero Zellen für weitere IFA verwendet. Im IFA wurde ausschließlich bei der Verwendung monoklonaler AK, jedoch nur bei fünf der elf, eine spezifische Fluoreszenz beobachtet. Nach der erfolgreichen Immunfluoreszenz mit monoklonalen AK, wurde der Versuch mit Patientenserum zu färben unter den bereits etablierten Bedingungen wiederholt. Jedoch trat, wie auch bei den transfizierten Zellen keine Fluoreszenz auf. Dieses Ergebnis war nicht vorhersehbar, da dies eine in der Diagnostik häufig angewandte Methode ist und im Vorfeld die Titer der Patientenseren mittels ELISA-Test als positiv bestimmt wurden. Auch einer anderen Arbeits-

gruppe, die mit demselben Plasmid-Konstrukt arbeitet, gelang bis jetzt nicht, Plasmid-exprimiertes HN nachweisen zu können. Es ist möglich, dass das N-terminale Myc-Epitop die Faltung des HN-Proteins beeinflusst und somit zu einem Funktionsverlust führt. Dies war jedoch nicht vorauszusehen, da die Synthese des HN-Proteins im Western Blot im Vorfeld nachgewiesen worden war (C. Rödner).

In weiterführenden Arbeiten sollte untersucht werden, ob tatsächlich durch Einfügen des N-terminalen Myc-Epitops die Faltung oder post-translationale Modifikation von HN so verändert wurden, dass die synthetisierten HN-Moleküle nicht mehr im IFA nachgewiesen werden können. Eine Möglichkeit wäre, das Myc-Epitop durch ein anderes Epitop zu ersetzen oder komplett aus dem Plasmid zu entfernen. Die Funktionalität könnte dann erneut in einem Fusionsassay überprüft werden. Sollte das HN_{JL}-Protein dadurch funktionell sein, kann dieses Konstrukt dazu verwendet werden, um die Etablierung der Versuchsbedingungen zur Immunfluoreszenzfärbung mit Patientenseren fortzuführen. Als Kontrolle sollten dabei in zukünftigen Versuchen kommerziell erhältliche Tests zum Nachweis von IgG-AK mittel Immunfluoreszenz verwendet werden (z.B. Viramed), um mögliche Fehlerquellen ermitteln und optimieren zu können. Nach der erfolgreichen Herstellung funktionsfähiger HN_{JL}-Plasmide und der Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung mit Patientenseren können die sechs HN-Konstrukte dementsprechend verändert und die Bindung der MuV AK getestet werden. Anschließend sollten rekombinante Viren mit Mutationen im HN-Protein hergestellt werden. Durch Vorinkubation dieser Viren mit den getesteten AK und anschließender Analyse, ob sie noch fähig sind, Zellen zu infizieren, kann ermittelt werden, welche natürlich auftretenden Mutationen die Bindung und Neutralisierung von durch Impfung oder Infektion entstandenen AK verhindern.

Aufgrund der zahlreichen MuV Ausbrüche in den letzten Jahren wird es in Zukunft dringend notwendig sein, die Wirksamkeit momentan verwendeter Impfstämme auf die beschriebene Weise zu prüfen. Sollten geringe Mutationen im HN-Protein zu einer ausbleibenden Immunantwort führen, muss über die Entwicklung eines neuen Impfstoffes nachgedacht werden.

VI. Literaturverzeichnis

1. **Šantak M, Lang-Balija M, Ivancic-Jelecki J, Košutić-Gulija T, Ljubin-Sternak S and others.** 2013. Antigenic differences between vaccine and circulating wild-type mumps viruses decreases neutralization capacity of vaccine-induced antibodies. *Epidemiology & Infection* **141**:1298-309.
2. **WHO.** 2007. Mumps Virus Vaccines. *Weekly epidemiological record* **82**:49-60.
3. **Richardson M, Elliman D, Maguire H, Simpson J, Nicoll A.** 2001. Evidence base of incubation periods, periods of infectiousness and exclusion policies for the control of communicable diseases in schools and preschools. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **20**.
4. **Philip BN, Reinhard KR, Lackman DB.** 1959. Observations on a mumps epidemic in a "virgin" population. *American Journal of Epidemiology* **69**:91-111.
5. **Foy HM, Cooney MK, Hall CE, Bor EVA, Maletzky AJ.** 1971. Isolation of mumps virus from children with acute lower respiratory tract disease. *American Journal of Epidemiology* **94**:467-72.
6. **Barták V.** 1973. Sperm count, morphology and motility after unilateral mumps orchitis. *Journal of Reproduction and Fertility* **32**:491-4.
7. **Candel S.** 1951. Epididymitis in mumps, including orchitis: further clinical studies and comments. *Annals of Internal Medicine* **34**:20-36.
8. **Davis NF, McGuire BB, Mahon JA, Smyth AE, O'Malley KJ and others.** 2010. The increasing incidence of mumps orchitis: a comprehensive review. *BJU International* **105**:1060-5.
9. **Hviid A, Rubin S, Mühlemann K.** 2008. Mumps. *The Lancet* **371**:932-44.
10. **Morrison J, Givens JR, Wiser WL, Fish SA.** 1975. Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. *Fertility and Sterility* **26**:655-9.
11. **Siegel M, Fuerst HT, Peress NS.** 1966. Comparative fetal mortality in maternal virus diseases. A prospective study on rubella, measles, mumps, chicken pox and hepatitis. *The New England journal of medicine* **274**:768-71.
12. **Mankertz A, Borgmann S, Santibanez S.** 2013. Diagnostic of mumps outbreaks in highly vaccinated populations in Germany. Robert Koch-Institut.
13. **RKI.** 1999. Interventionsprogramm „Masern, Mumps, Röteln (MMR)“.
14. **Broliden K, Abreu ER, Arneborn M, Böttiger M.** 1998. Immunity to mumps before and after MMR vaccination at 12 years of age in the first generation offered the two-dose immunization programme. *Vaccine* **16**:323-7.
15. **Anis E, Grotto I, Moerman L, Warshavsky B, Slater PE and others.** 2012. Mumps outbreak in Israel's highly vaccinated society: are two doses enough? *Epidemiology & Infection* **140**:439-46.
16. **Ivancic-Jelecki J, Santak M, Forcic D.** 2008. Variability of hemagglutinin-neuraminidase and nucleocapsid protein of vaccine and wild-type mumps virus strains. *Infection, Genetics and Evolution* **8**:603-13.

17. **Eriksen J, Davidkin I, Kafatos G, Andrews N, Barbara C and others.** 2013. Seroepidemiology of mumps in Europe (1996–2008): why do outbreaks occur in highly vaccinated populations? *Epidemiology & Infection* **141**:651-66.
18. **Emma S, Mary R, Joanne W, Stuart B, Heather L and others.** 2005. Mumps outbreaks across England and Wales in 2004: observational study. *BMJ* **330**.
19. **Nöjd J, Tecle T, Samuelsson A, Örvell C.** 2001. Mumps virus neutralizing antibodies do not protect against reinfection with a heterologous mumps virus genotype. *Vaccine* **19**:1727-31.
20. **Jin L, Rima B, Brown D, Örvell C, Tecle T and others.** 2005. Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains: Preliminary standardisation of the nomenclature. *Arch. Virol.* **150**:1903-9.
21. **WHO.** 2012. Mumps virus nomenclature update: 2012. *Weekly epidemiological record* **87**:217-24.
22. **Johansson B, Tecle T, Ouml, rvell C.** 2002. Proposed Criteria for Classification of New Genotypes of Mumps Virus. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **34**:355-7.
23. **WHO.** 2005. Global status of mumps immunization and surveillance. *Weekly epidemiological record* **80**:417-24.
24. **Yates PJ, Afzal MA, Minor PD.** 1996. Antigenic and genetic variation of the HN protein of mumps virus strains. *Journal of General Virology* **77**:2491-7.
25. **Mühlemann K.** 2004. The molecular epidemiology of mumps virus. *Infection, Genetics and Evolution* **4**:215-9.
26. **Lamb R, Kolakofsky D.** 2001. Paramyxoviridea: The Viruses and their replication. *Fields Virology 4th Edition*:1305-40.
27. **East JL, Kingsbury DW.** 1971. Mumps Virus Replication in Chick Embryo Lung Cells: Properties of Ribonucleic Acids in Virions and Infected Cells. *Journal of Virology* **8**:161-73.
28. **Rubin SA, Link MA, Sauder CJ, Zhang C, Ngo L and others.** 2012. Recent Mumps Outbreaks in Vaccinated Populations: No Evidence of Immune Escape. *Journal of Virology* **86**:615-20.
29. **Elango N, Varsanyi TM, Kövamees J, Norrby E.** 1988. Molecular Cloning and Characterization of Six Genes, Determination of Gene Order and Intergenic Sequences and Leader Sequence of Mumps Virus. *Journal of General Virology* **69**:2893-900.
30. **Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzle H.** 2010. Molekulare Virologie Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
31. **Tanabayashi K, Takeuchi K, Hishiyama M, Yamada A, Tsurudome M and others.** 1990. Nucleotide sequence of the leader and nucleocapsid protein gene of mumps virus and epitope mapping with the in vitro expressed nucleocapsid protein. *Virology* **177**:124-30.
32. **Elliott GD, Afzal MA, Martin SJ, Rima BK.** 1989. Nucleotide sequence of the matrix, fusion and putative SH protein genes of mumps virus and their deduced amino acid sequences. *Virus Research* **12**:61-75.
33. **Takeuchi K, Tanabayashi K, Hishiyama M, Yamada A.** 1996. The Mumps Virus SH Protein Is a Membrane Protein and Not Essential for Virus Growth. *Virology* **225**:156-62.

34. **Rima BK, Roberts MW, McAdam WD, Martin SJ.** 1980. Polypeptide Synthesis in Mumps Virus-infected Cells. *Journal of General Virology* **46**:501-5.
35. **Herrler G, Compans RW.** 1982. Synthesis of mumps virus polypeptides in infected vero cells. *Virology* **119**:430-8.
36. **Emerson SU, Yu Y.** 1975. Both NS and L proteins are required for in vitro RNA synthesis by vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* **15**:1348-56.
37. **Conzelmann K-K.** 1996. Genetic manipulation of non-segmented negative-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* **77**:381-9.
38. **Xu P, Luthra P, Li Z, Fuentes S, D'Andrea JA and others.** 2012. The V Protein of Mumps Virus Plays a Critical Role in Pathogenesis. *Journal of Virology* **86**:1768-76.
39. **Kövamees J, Norrby E, Elango N.** 1989. Complete nucleotide sequence of the hemagglutinin-neuraminidase (HN) mRNA of mumps virus and comparison of paramyxovirus HN proteins. *Virus Research* **12**:87-96.
40. **Hiebert SW, Paterson RG, Lamb RA.** 1985. Hemagglutinin-neuraminidase protein of the paramyxovirus simian virus 5: nucleotide sequence of the mRNA predicts an N-terminal membrane anchor. *Journal of Virology* **54**:1-6.
41. **Crennell S, Takimoto T, Portner A, Taylor G.** 2000. Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat Struct Mol Biol* **7**:1068-74.
42. **Markwell MA, Fox CF.** 1980. Protein-protein interactions within paramyxoviruses identified by native disulfide bonding or reversible chemical cross-linking. *Journal of Virology* **33**:152-66.
43. **Lamb RA, Paterson RG, Jardetzky TS.** 2006. Paramyxovirus membrane fusion: Lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* **344**:30-7.
44. **Jensik SC, Silver S.** 1976. Polypeptides of mumps virus. *Journal of Virology* **17**:363-73.
45. **Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M.** 2001. Immunologie Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
46. **Pomeroy LW, Bjornstad ON, Holmes EC.** 2008. The evolutionary and epidemiological dynamics of the paramyxoviridae. *Journal of molecular evolution* **66**:98-106.
47. **Orvell C, Alsheikhly AR, Kalantari M, Johansson B.** 1997. Characterization of genotype-specific epitopes of the HN protein of mumps virus. *Journal of General Virology* **78**:3187-93.
48. **Cusi MG, Fischer S, Sedlmeier R, Valassina M, Valensin PE and others.** 2001. Localization of a new neutralizing epitope on the mumps virus hemagglutinin–neuraminidase protein. *Virus Research* **74**:133-7.
49. **Kövamees J, Rydbeck R, Örvell C, Norrby E.** 1990. Hemagglutinin-neuraminidase (HN) amino acid alterations in neutralization escape mutants of Kilham mumps virus. *Virus Research* **17**:119-29.
50. **Orvell C.** 1984. The reactions of monoclonal antibodies with structural proteins of mumps virus. *The Journal of Immunology* **132**:2622-9.
51. **Örvell C, Tecle T, Johansson B, Saito H, Samuelson A.** 2002. Antigenic relationships between six genotypes of the small hydrophobic protein gene of mumps virus. *Journal of General Virology* **83**:2489-96.

52. **Afzal MA, Buchanan J, Heath AB, Minor PD.** 1997. Clustering of mumps virus isolates by SH gene sequence only partially reflects geographical origin. *Arch. Virol.* **142**:227-38.
53. **Kulkarni-Kale U, Ojha J, Manjari GS, Deobagkar DD, Mallya AD and others.** 2007. Mapping antigenic diversity and strain specificity of mumps virus: A bioinformatics approach. *Virology* **359**:436-46.
54. **Peltola H, Kulkarni PS, Kapre SV, Paunio M, Jadhav SS and others.** 2007. Mumps Outbreaks in Canada and the United States: Time for New Thinking on Mumps Vaccines. *Clinical Infectious Diseases* **45**:459-66.
55. **Utz S, Richard J-L, Capaul S, Matter HC, Hrisoho MG and others.** 2004. Phylogenetic analysis of clinical mumps virus isolates from vaccinated and non-vaccinated patients with mumps during an outbreak, Switzerland 1998–2000. *Journal of Medical Virology* **73**:91-6.
56. **Barskey AE, Schulte C, Rosen JB, Handschur EF, Rausch-Phung E and others.** 2012. Mumps Outbreak in Orthodox Jewish Communities in the United States. *New England Journal of Medicine* **367**:1704-13.
57. **Greenland K, Whelan J, Fanoy E, Borgert M, Hulshof K and others.** 2012. Mumps outbreak among vaccinated university students associated with a large party, the Netherlands, 2010. *Vaccine* **30**:4676-80.
58. **Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R.** 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59-74.
59. **Jensen FC, Girardi AJ, Gilden RV, Koprowski H.** 1964. Infection of human and simian tissue cultures with rous sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **52**:53-9.
60. **Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF.** 2008. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current protocols in microbiology* **Appendix 4**:Appendix 4E.
61. **Rödner C.** 2011. Molekulare Untersuchungen des SH Proteins des Mumpsvirus und der attenuierten Vakzine. Berlin: Technische Universität Berlin.
62. **Johnston JA, Ward CL, Kopito RR.** 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**:1883-98.
63. **Kaulfus D.** 2007. Aggresom. Laborjournal.
64. **Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher EJ, Sztul ES.** 1999. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* **146**:1239-54.
65. **Dobson CM.** 2003. Protein folding and misfolding. *Nature* **426**:884-90.
66. **Sanderson CM, Avalos R, Kundu A, Nayak DP.** 1995. Interaction of Sendai Viral F, HN, and M Proteins with Host Cytoskeletal and Lipid Components in Sendai Virus-Infected BHK Cells. *Virology* **209**:701-7.
67. **Rödner C.** 2011. Molekulare Untersuchungen des SH Proteins des Mumpsvirus und der attenuierten Vakzine [Doktorarbeit]. Berlin: Technische Universität Berlin.
68. **Takimoto T, Taylor GL, Connaris HC, Crennell SJ, Portner A.** 2002. Role of the Hemagglutinin-Neuraminidase Protein in the Mechanism of Paramyxovirus-Cell Membrane Fusion. *Journal of Virology* **76**:13028-33.

69. **Tanabayashi K, Takeuchi K, Okazaki K, Hishiyama M, Yamada A.** 1993. Identification of an amino acid that defines the fusogenicity of mumps virus. *J Virol* **67**:2928-31.
70. **Horvath CM, Paterson RG, Shaughnessy MA, Wood R, Lamb RA.** 1992. Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: factors influencing formation of syncytia. *Journal of Virology* **66**:4564-9.
71. **Sanderson CM, Wu HH, Nayak DP.** 1994. Sendai virus M protein binds independently to either the F or the HN glycoprotein in vivo. *J Virol* **68**:69-76.
72. **Groß U.** 2006. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie Stuttgart: Thieme.
73. **Dayan GH, Rubin S, Plotkin S.** 2008. Mumps Outbreaks in Vaccinated Populations: Are Available Mumps Vaccines Effective Enough to Prevent Outbreaks? *Clinical Infectious Diseases* **47**:1458-67.
74. **Rubin S, Mauldin J, Chumakov K, Vanderzanden J, Iskow R and others.** 2006. Serological and phylogenetic evidence of monotypic immune responses to different mumps virus strains. *Vaccine* **24**:2662-8.
75. **Rubin SA, Qi L, Audet SA, Sullivan B, Carbone KM and others.** 2008. Antibody Induced by Immunization with the Jeryl Lynn Mumps Vaccine Strain Effectively Neutralizes a Heterologous Wild-Type Mumps Virus Associated with a Large Outbreak. *Journal of Infectious Diseases* **198**:508-15.
76. **Matsubara K, Iwata S, Nakayama T.** 2012. Antibodies against mumps virus component proteins. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* **18**:466-71.

VII. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Frau PD Dr. Annette Mankertz und Dr. Nicole Friedrich bedanken für die Bereitstellung des Themas und der intensiven Betreuung während der Anfertigung meiner Bachelorarbeit.

Zusätzlich möchte ich mich bei meinen Gutachtern Frau PD Dr. Annette Mankertz und Herr Prof. Dr. Rupert Mutzel für die Übernahme des Gutachtens bedanken.

Bei Prof. Dr. Reinhard Burger und Prof. Dr. Martin Mielke bedanke ich mich für die exzellenten Arbeitsmöglichkeiten in der Abteilung „Infektionskrankheiten“ am Robert Koch-Institut.

Vielen lieben Dank Nicole für die Ruhe, die du immer ausgestrahlt hast auch wenn es mal etwas stressig wurde und deinen fachlichen Ratschlägen bei der Planung und Durchführung von Versuchen. Danke auch für die lehrreichen Laborbesprechungen, in denen man sich auch über sein Themengebiet hinaus weiterbilden konnte und die nie langweilig wurden.

Bei Anne Wolbert möchte ich mich recht herzlich bedanken für die ständige Hilfsbereitschaft bei Fragen und plötzlich auftretenden Problemen. Bei dem gesamten NRZ-Team (Dr. Sabine Santibanez, Ingrid Deitemeier, Petra Kurzendörfer, Christine Schwerdtfeger und Cornelia Lentz) bedanke ich mich für die Bereitstellung der Patientenseren und die ständige Unterstützung in all meinem Tun und Handeln.

Für die monoklonalen Antikörper möchte ich mich bei Herr Dr. C. Örvell bedanken und für die Einarbeitung und permanente Betreuung am konfokalen Laser-Raster Mikroskop (kLSM) bei Herr Dr. Kazimierz Madela.

Einen besonderen Dank möchte ich all meinen Laborkollegen für die angenehme Atmosphäre widmen. Ich danke Steffi für die Geduld, mit der sie all meine Fragen beantwortet hat, Paul für die umfangreichen Schutzmaßnahmen während seiner Arbeitstätigkeiten, Micha für die korrekte Formulierung der Gerichte in der Cafeteria und die Bereitschaft all meine modischen Sonderwünsche zu erfüllen und natürlich Anna für die aufmunternden, witzigen und geistreichen Worte und das lange Grübeln, wenn mal etwas nicht geklappt hat.

Zum Schluss bedanke ich mich natürlich auch bei all meinen Freunden und bei meiner Familie für die Unterstützung während meines gesamten Bachelorstudiums und für das Verständnis meiner mangelnden Zeit in den vergangenen Wochen.