

Charakterisierung neutralisierender Epitope des Hämagglutinins aktueller Maserwildviren im Vergleich zum Impfvirus

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kerstin Beer, geb. Meyer

aus Frankfurt (Oder)

Jahr der Einreichung

2012

Die Dissertation wurde von Juli 2008 bis September 2012 unter der Leitung von PD Dr. Annette Mankertz am Robert Koch-Institut angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Annette Mankertz

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 27.11.2012

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1.	Das Masernvirus	7
1.1.1.	Pathogenese	7
1.1.2.	Taxonomische Einordnung	9
1.1.3.	Genetische Typisierung	9
1.1.4.	Molekulare Epidemiologie	10
1.1.5.	Aufbau des Maservirus	11
1.1.6.	Das Oberflächenprotein Hämagglutinin	12
1.1.7.	Wirtszellrezeptoren	14
1.2.	Die Immunantwort	17
1.2.1.	Die angeborene und adaptive Immunantwort	17
1.2.2.	Klassifikation und Eigenschaften von Antikörpern	18
1.2.3.	Die Rolle neutralisierender Antikörper innerhalb der MV-Immunität	19
1.2.4.	Neutralisierende Epitope des H-Proteins	19
1.3.	Die Masernimpfung	21
1.3.1.	Masernimpfviren	21
1.3.2.	Impfempfehlungen und Impfquoten	22
1.3.3.	Maternale Antikörper	23
1.3.4.	Alternative Ansätze in der Impfstoffentwicklung	23
2.	Problemstellung und Zielsetzung	25
3.	Materialien	26
4.	Methoden	37
4.1.	Zellbiologische Methoden	37
4.1.1.	Kultivierung von Zellen	37
4.1.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
4.1.3.	Transfektion von Zellen	38
4.2.	Virologische Methoden	38
4.2.1.	Anzucht von Masernviren	38
4.2.2.	Virusinaktivierung	39
4.2.3.	Virusaufreinigung	39
4.2.4.	Colorimetrischer Immunoassay	39
4.2.5.	Bestimmung der Viruskonzentration	40

Inhaltsverzeichnis

4.2.6.	Neutralisationstest – <i>Focus of infection reduction neutralization test</i>	40
4.3.	Herstellung monoklonaler Antikörper	42
4.3.1.	Immunisierung, Blutabnahme und Tötung der Versuchstiere	42
4.3.2.	Präparation von Myeloma-, Milz- und Thymuszellen	43
4.3.3.	Herstellung von Hybridomzellen	44
4.3.4.	Subklonierung von Hybridomzellen	45
4.3.5.	<i>Screening-Focus of infection reduction neutralization test</i>	45
4.3.6.	Durchflusszytometrische Analyse	46
4.3.7.	Aufreinigung von Antikörpern	46
4.3.8.	Isotypbestimmung	47
4.4.	Proteinbiochemische Methoden	48
4.4.1.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	48
4.4.2.	Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese	48
4.4.3.	Western Blot Analyse	48
4.4.4.	Immunpräzipitation	49
4.4.5.	<i>Peptide Microarray</i>	50
4.4.6.	Immunfluoreszenztest	51
4.4.7.	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	51
4.4.7.1.	Aviditäts-ELISA	52
4.4.8.	Massenspektrometrische Analyse	53
4.5.	Molekularbiologische Methoden	54
4.5.1.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	54
4.5.2.	Isolierung viraler RNA und cDNA-Synthese	54
4.5.3.	Polymerasekettenreaktion	54
4.5.4.	Agarosegelelektrophorese	55
4.5.5.	Nukleinsäuresequenzierung	55
4.5.6.	Amplifikation des H-Gens zur Sequenzanalyse	56
4.5.7.	Konstruktion eines Expressionsplasmids	57
4.5.7.1.	Mutagenese des H-Gens	59
5.	Ergebnisse	61
5.1.	Sequenzanalyse des H-Proteins	61
5.2.	Gewinnung und Charakterisierung MV-neutralisierender und H-spezifischer mAk64	
5.2.1.	Präparation eines Antigens zur Immunisierung	64
5.2.2.	Nachweis neutralisierender Antikörper gegen MV im murinen Antiserum	66
5.2.3.	Gewinnung MV-spezifischer mAk	68
5.2.4.	Reinheit und Individualität der mAk	70

Inhaltsverzeichnis

5.2.5.	Isotypbestimmung der mAk	72
5.2.6.	H-Spezifität der mAk	72
5.2.7.	Bestimmung der Avidität der mAk	74
5.3.	Epitopbestimmung	76
5.4.	Rezeptorabhängige Virusneutralisation	80
5.5.	Neutralisierende Kapazität der mAk gegenüber Impf- und Wildtyp-Viren	81
5.6.	Neutralisierende Kapazität humaner Antiseren gegenüber MV	83
5.7.	Ursachen für einen Epitopverlust von Wildtyp-Viren im Vergleich zum Impfvirus	84
5.7.1.	Epitop des mAk RKI-MV-1d – <i>Neutralizing epitope</i> (NE)	85
5.7.2.	Epitop des mAk RKI-MV-33a – <i>Hemagglutinin noose epitope</i> (HNE)	87
5.7.3.	Epitop des mAk RKI-MV-34c	90
5.7.4.	Weitere neutralisierende Epitope	92
6.	Diskussion	93
6.1.	Die Variabilität des H-Proteins	93
6.2.	Eigenschaften der erzeugten mAk	95
6.3.	Einfluss der mAk auf die Interaktion zwischen MV und zellulärem Rezeptor	96
6.4.	Konservierte Epitope des H-Proteins	97
6.4.1.	Epitop des mAk RKI-MV-12b	98
6.4.2.	Epitop des mAk RKI-MV-34c	98
6.5.	Variable Epitope des H-Proteins	99
6.5.1.	Epitop des mAk RKI-MV-33a – <i>Hemagglutinin noose epitope</i> (HNE)	99
6.5.2.	Epitop des mAk RKI-MV-1d – <i>Neutralizing epitope</i> (NE)	101
6.5.3.	Epitop des mAk RKI-MV-13a	104
6.5.4.	Epitop des mAk RKI-MV-9c	104
6.5.5.	Epitop des mAk RKI-MV-32c	105
6.6.	Effizienz aktueller Impfviren	105
7.	Zusammenfassung	107
8.	Summary	109
9.	Abkürzungsverzeichnis	111
10.	Abbildungsverzeichnis	115
11.	Tabellenverzeichnis	117
12.	Literaturverzeichnis	119

Inhaltsverzeichnis

13.	Liste eigener Veröffentlichungen	133
14.	Danksagung	134
15.	Lebenslauf	135

1. Einleitung

1.1. Das Masernvirus

1.1.1. Pathogenese

Das Masernvirus (MV) verursacht die hoch ansteckende Krankheit Masern, welche im Jahr 2010 ca. 139.000 Todesfällen weltweit verursachte (154). Masern ist unter den impfpräventablen Krankheiten für die höchste Anzahl von Todesfällen bei Kindern verantwortlich. Das Virus wird durch Aerosole übertragen und breitet sich nach Infektion der Schleimhautzellen über den Respirationstrakt im Bronchialraum aus. Wenige Tage nach der Infektion können erste Symptome wie Fieber, Husten, Schnupfen, Bindehautentzündungen und Kopliksche Flecken an der Mundschleimhaut auftreten (63, 83) (Abb. 1).

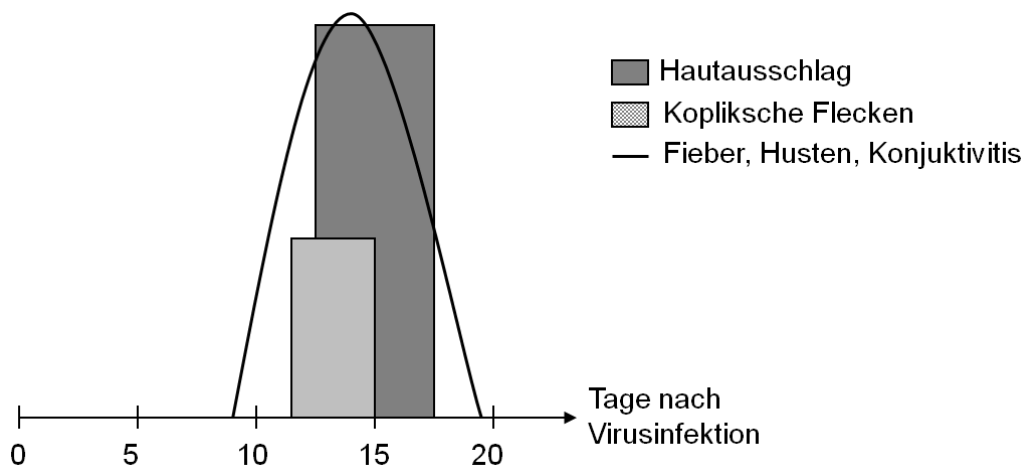


Abb. 1: Klinische Symptome einer Masernerkrankung. (modifiziert nach Knipe *et al.* (63))

Ein bis zwei Wochen nach einer MV-Infektion können Symptome wie Fieber, Husten, Konjunktivitis und Kopliksche Flecken auftreten. Zusätzlich bilden sich Exantheme auf der Haut. Nach wenigen Tagen klingen die Symptome ab.

Das Virus wird über infizierte Makrophagen und dendritische Zellen in lokale Lymphknoten transportiert, wo es weitere Zellen (z. B. Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen) infiziert (37, 63, 83). Über den Blutkreislauf infiziert das MV viele Organe, z. B. die des Gastrointestinaltrakts, aber auch Harnblase, Leber, Niere, Haut und Thymus (63, 83). Nach einem kurzen Absinken des Fiebers erfolgt ein zweiter Fieberanstieg verbunden mit einem Hautausschlag, der sich vom Gesicht über den ganzen Körper ausbreitet und wenige Tage andauert (63, 83) (Abb. 1). Das MV wirkt

immunsuppressiv und ist neurotrop. Die Virusinfektion kann Komplikationen wie Mittelohrentzündung, Thrombozytopenie, Leberentzündungen, Pneumonien oder Diarrhö verursachen (41, 83). In seltenen Fällen kommt es zu einer neuronalen Erkrankung mit schwerwiegenden Folgen (Abb. 2). Die Autoimmunenzephalitis (ADME), auch akute para- oder postinfektiöse Enzephalitis genannt, tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von $1:10^{-3}$ Erkrankten unmittelbar nach dem Hautausschlag auf. Diese Autoimmunreaktion führt zu Benommenheit, Delirium, Lähmungserscheinungen und bei 10 – 20 % der Erkrankten bis zum Tod (52, 83). Einige Monate nach einer Erstinfektion kann sich bei immunsupprimierten Patienten die stets tödlich verlaufende akute Einschlußkörperchenenzephalitis (MIBE) ausbilden (28, 83, 137). Die ebenfalls tödlich verlaufende Subakute Sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) ist Folge einer persistenten MV-Infektion im Zentralen Nervensystem und tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von $1:10^{-4}$ – $1:10^{-5}$ erst Jahre nach einer akuten MV-Infektion auf (82, 83). Das Risiko einer SSPE steigt erheblich, wenn Kinder im Säuglingsalter mit einem MV infiziert werden. Auf welchem Weg das Virus in das Zentrale Nervensystem gelangt ist bisher nicht genau bekannt. Vermutungen weisen auf zerebrale Endothelzellen im Gehirn als mögliche Eintrittspforte hin (36).

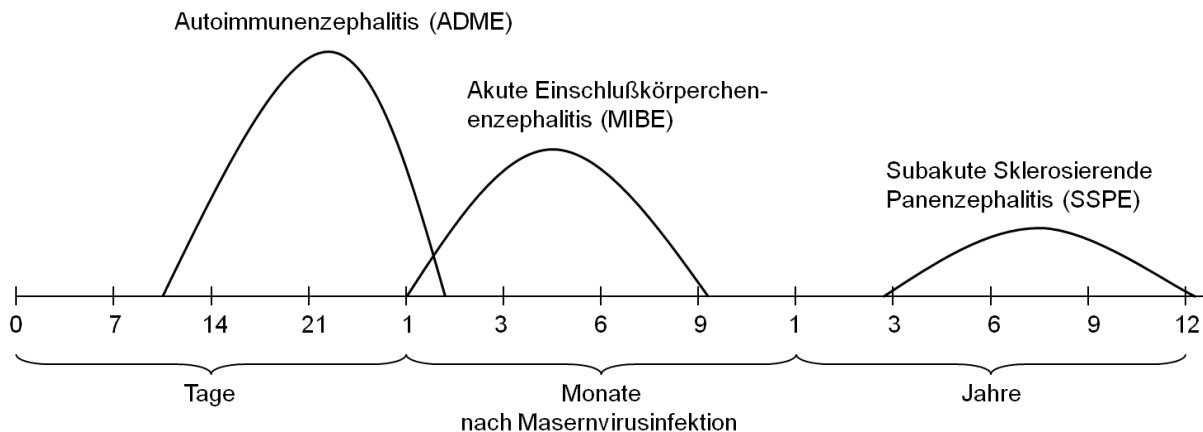


Abb. 2: Neuronale Erkrankungen nach einer MV-Infektion. (modifiziert nach Knipe *et al.* (63))
 Wenige Tage nach einer Infektion kann eine Autoimmunenzephalitis (ADME) auftreten. Immunsupprimierte Personen können Monate nach einer MV-Infektion an einer tödlichen akuten Einschlußkörperchenenzephalitis (MIBE) erkranken. Jahre nach der Infektion ist eine Erkrankung an der stets tödlich verlaufenden Subakuten Sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE) möglich.

1.1.2. Taxonomische Einordnung

Das MV gehört mit seinem einzelsträngigen und nichtsegmentierten (*Mono-*) RNA-Genom in negativ-Strang-Orientierung (*-nega*) zur Ordnung der *Mononegavirales*. Die zugehörige Familie der *Paramyxoviridae* wird in die Unterfamilien *Pneumovirinae* und *Paramyxovirinae* gegliedert. Zu den *Pneumovirinae* gehören *Metapneumoviren* und *Pneumoviren*. *Avula-*, *Henipa-*, *Respiro-*, *Rubula-* und *Morbilliviren* werden den *Paramyxovirinae* zugeordnet. Das MV ist der einzige humanpathogene Vertreter des Genus *Morbillivirus* (61) (Abb. 3).

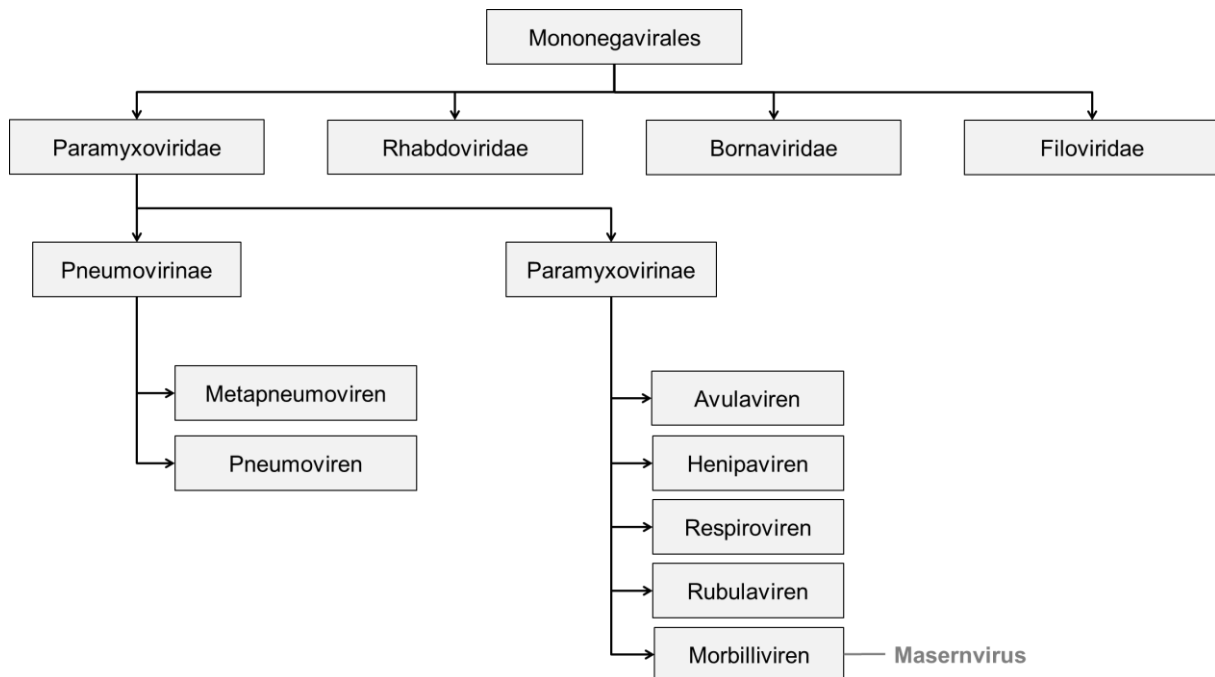


Abb. 3: Taxonomische Einordnung des Masernvirus.

Das MV wird der Ordnung der Mononegavirales, Familie der Paramyxoviridae, Unterfamilie der Paramyxovirinae und dem Genus Morbilliviren zugeordnet.

1.1.3. Genetische Typisierung

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat eine standardisierte Nomenklatur für die genetische Charakterisierung der serologisch monotypischen Masern-Wildtyp-Viren festgelegt (155). Die genetische Typisierung von MV erfolgt über eine phylogenetische Analyse auf Basis der Sequenz der 450 Nukleotide, welche die 150 C-terminalen Aminosäuren (AS) des viralen Nukleoproteins (N) kodieren (N-450), und unter Einbeziehung der Sequenzdaten festgelegter Referenzstämme (115, 155). Zusätzlich kann die Sequenz des Oberflächenproteins Hämagglutinin (H) herangezogen werden (155). Anhand dieser Sequenzen werden detektierte Wildtyp-Viren in acht phylogenetische Gruppen eingeteilt: A, B, C, D, E, F, G und H.

Innerhalb dieser Gruppen gibt es bisher 24 anerkannte Genotypen: A, B1, B2, B3, C1, C2, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, E, F, G1, G2, G3, H1 und H2 (115, 155). Jedes phylogenetisch charakterisierte MV-Isolat erhält der WHO-Nomenklatur entsprechend eine Virusbezeichnung, die zusätzlich Informationen über den Ort und die Zeit der Probenahme des Patienten beinhaltet (155).

1.1.4. Molekulare Epidemiologie

Die im Jahr 2001 in Deutschland eingeführte Meldepflicht von Masernerkrankungsfällen ermöglicht die systematische Beschreibung der Viruszirkulation (1). Zur Aufklärung von Übertragungswegen werden Informationen zur klinischen Epidemiologie im Zusammenhang mit den genetischen Daten des detektierten MV analysiert. Die systematische Überwachung der MV in Deutschland zeigt, dass Viren der Genotypen C2, D6 und D7 bis zum Jahr 2002 endemisch zirkulierten (110). In den folgenden zwei Jahren brach die endemische Zirkulation ab. Seitdem kam es immer wieder zu regionalen Ausbrüchen durch importierte MV. Im Jahr 2005 fand beispielsweise ein Masernausbruch in Bayern statt, bei dem die nachgewiesenen Genotyp D6-Viren vermutlich aus Ländern der ehemaligen Sowjetunion oder der Türkei importiert worden sind (110). Bei einem Ausbruch in Nordrhein-Westfalen im Jahr 2006 wurden Genotyp D6-Viren nachgewiesen (157, 158), welche zuvor eine Epidemie in der Ukraine verursacht hatten (110). In der Region Stuttgart/Esslingen verursachten im selben Jahr Viren vom Genotyp B3 einen Masernausbruch (110). Surveillance Daten zeigen, dass die in europäischen Ländern detektierten Genotyp B3-Viren meist aus Afrika importiert worden sind (112, 115). Von 2006 bis 2009 lief in der Schweiz eine Masernepidemie ab, bei der MV des Genotyps D5 nachgewiesen wurden (105). Dieses Virus wurde vermutlich aus Thailand importiert (115). In Folge dieser Epidemie traten sekundäre Ausbrüche in den Nachbarländern Deutschland (96), Österreich (124) und Frankreich (150) auf. Ein Ausbruch in Nordrhein-Westfalen im Jahr 2007 wurde durch Genotyp D8-Viren ausgelöst (110), die im südostasiatischen Raum endemisch zirkulieren und wiederholt Ausbrüche in Europa verursachen (115). Ende 2008 wurde ein Genotyp D4-Virus von Indien über London nach Hamburg importiert. Es verursachte im Frühjahr 2009 in Hamburg und Niedersachsen einen Ausbruch bevor es weiter nach Bulgarien übertragen wurde und dort eine Epidemie auslöste. Mehr als 25.000 Personen erkrankten in Europa aufgrund dieser transkontinentalen MV-Übertragung

(77). In Mittel- und Ostasien endemische Genotyp H1-Viren treten nur sporadisch in Europa auf (155).

1.1.5. Aufbau des Maservirus

Das Viruspartikel hat eine überwiegend sphärische Struktur mit einem Durchmesser von 150 – 250 nm (63, 83) (Abb. 4a). Es besitzt ein einzelsträngiges, negativ-orientiertes und nichtsegmentiertes RNA-Genom mit einer Länge von weniger als 16 kbp (63, 83). Das Genom bildet zusammen mit dem Large (L)-, Phospho (P)- und Nukleokapsid (N)-Protein einen Nukleokomplex (83, 103). Das L-Protein (ca. 200 kDa) besitzt die enzymatische Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase und ist mit dem P-Protein (ca. 72 kDa) assoziiert (11, 51, 83, 127). Das N-Protein (ca. 60 kDa) ist mit dem L-P-Komplex und der genomischen RNA assoziiert und schützt diese vor einem Abbau durch zelluläre Nukleasen (8, 83). Die Interaktion des N-Proteins mit Translations-Initiationsfaktoren der Wirtszelle unterstützt außerdem die Inhibierung der Translation der Wirtszellproteine (119). Das P-Gen kodiert für drei Proteine: das P-, C- und V-Protein (Abb. 4b). Das C- und V-Protein sind Nichtstrukturproteine, die in die Modulation der Wirtszelle nach ihrer Infektion involviert sind und Einfluss auf die Signalwege der angeborenen Immunantwort und die Virusreplikation nehmen (17, 35, 64, 69, 138). Der Nukleokomplex ist von einer Doppellipidmembran umgeben, mit deren Innenseite das Matrix (M)-Protein (ca. 36 kDa) assoziiert ist (83). Das M-Protein interagiert mit dem N-Protein. Diese Interaktion ermöglicht eine Regulation der viralen RNA-Synthese und das Ausschleusen des Virus aus der Zelle (57, 116).

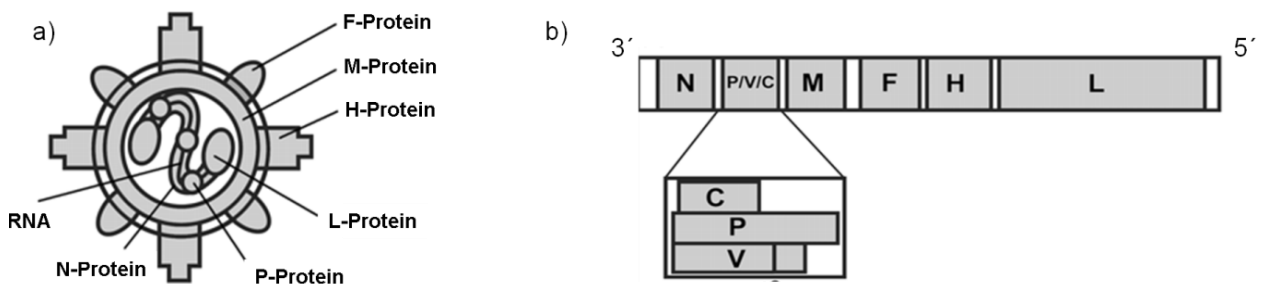


Abb. 4: Aufbau und Genomstruktur des MV. (modifiziert nach Yanagi *et al.* (161))

a) Das MV besitzt eine sphärische Struktur mit einem einzelsträngigen, negativ-orientierten RNA-Genom und den Strukturproteinen H, F, M, N, P und L.

b) Das nichtsegmentierte RNA-Genom enthält sechs Gene, wobei das P-Gen überlappende Leseraster für P, V und C kodiert. Zwischen den Genen befinden sich Sequenzen zur Regulation der Transkription.

Auf der Oberfläche des MV befindet sich das glykosylierte F-Protein. Dieses Typ-I Membranprotein besteht aus den Untereinheiten F1 (ca. 41 kDa) und F2 (ca. 18 – 20 kDa), welche durch die Spaltung des inaktiven Vorläuferproteins F0 durch eine Endoprotease gebildet werden (121). Die beiden Untereinheiten bleiben über eine Disulfidbrücke verbunden und vermitteln nach Interaktion mit dem zweiten Oberflächenprotein, dem Hämagglutinin (H), die Fusion des Viruspartikels mit der Zellmembran (75, 159).

1.1.6. Das Oberflächenprotein Hämagglutinin

Das glykosylierte Typ-II Transmembranprotein H (ca. 80 kDa) vermittelt die virale Adsorption an die MV-spezifischen Rezeptoren der Wirtszelle. Das H-Protein des MV besitzt eine kubische Struktur und hat im Unterschied zu anderen Paramyxoviren keine Neuraminidasefunktion (46, 83). Es besteht aus 617 Aminosäuren (AS), die einen N-terminalen zytoplasmatischen Bereich, eine Transmembranregion, eine membran-nahe Stiel-Region und eine C-terminale Rezeptor-Bindedomäne bilden (5, 19, 46, 63, 120) (Abb. 5a). Die sechs β -Faltblätter (β 1 – β 6) der C-terminalen Rezeptor-Bindedomäne formen eine Propeller-ähnliche Struktur, wobei jedes Faltblatt aus vier antiparallelen Strängen (S1 – S4) besteht (46, 66) (Abb. 5b). Die Propellerstruktur wird hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den S1 Strängen stabilisiert (19). Disulfidbrücken, die in der Stiel-Region zwischen zwei H-Proteinen ausgebildet sind, stabilisieren und formen ein Homodimer (46, 97). Auf der Virusoberfläche wird das H-Protein als Tetramer aus zwei Homodimeren exprimiert (66, 75). Das H-Protein ist ein Glykoprotein mit Asparagin (N)-gebundenen Oligosacchariden. Diese gebundenen Glykane beeinflussen Proteine in ihrer Konformation, Stabilität und Löslichkeit. Sie können Proteine vor einem proteolytischen Abbau schützen und ihre Immunogenität beeinflussen. Potentielle Glykosylierungsstellen weisen die AS-Sequenz NXS oder NXT auf, wobei S für Serin, T für Threonin und X für eine beliebige Aminosäure außer Prolin (P) steht (3). Strukturanalysen des häufig untersuchten MV-Stammes Edmonston zeigten, dass das H-Protein fünf potentielle Glykosylierungsstellen an N168, N187, N200, N215 und N238 aufweist (5), wobei N238 nicht glykosyliert wird (54). Die Oligosaccharide an N200 und N215 befinden sich zwischen den Monomeren eines H-Homodimers (46) (Abb. 5a). Die N-Glykane bedecken große Bereiche der Oberfläche des H-

Proteins. Die unbedeckten Bereiche können mit den Wirtszellrezeptoren interagieren und von Antikörpern (Ak) erkannt werden (46, 48).

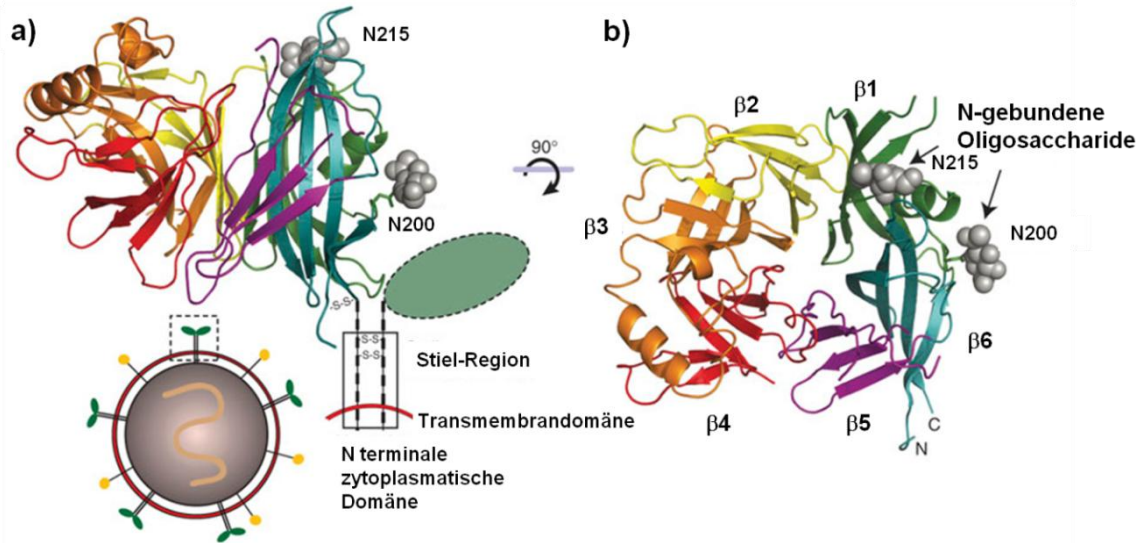


Abb. 5: Aufbau des Oberflächenproteins Hämaggutinin (H). (modifiziert nach Colf *et al.* (19))
 a) Das Oberflächenprotein H besitzt eine N-terminale zytoplasmatische Domäne, eine Transmembrandomäne, eine extrazelluläre Stiel-Region und extrazelluläre C-terminalen Rezeptor-Bindedomäne, die durch β -Faltblätter geformt wird.
 b) Die C-terminale Rezeptor-Bindedomäne des H-Proteins besteht aus einer Propeller-ähnlichen Anordnung der Faltblätter $\beta 1 - \beta 6$ ($\beta 1$ = grün, $\beta 2$ = gelb, $\beta 3$ = orange, $\beta 4$ = rot, $\beta 5$ = violett, $\beta 6$ = blau) und besitzt Glykane an N215 (grau) und N200 (grau).

Nach Bindung des H-Proteins an seinen Rezeptor findet eine Konformationsänderung des H-Proteins statt, welche das F-Protein stimuliert die Membranfusion einzuleiten. Aktuell werden dazu zwei Modelle diskutiert: Während Navaratnarajah *et al.* vermuteten, dass sich die Position der zwei C-terminalen Rezeptor-Bindedomänen eines H-Dimers verändert (91) (Abb. 6a), nehmen Hashiguchi *et al.* an, dass sich die Position der H-Dimere eines Tetramers zueinander verändert (48) (Abb. 6b).

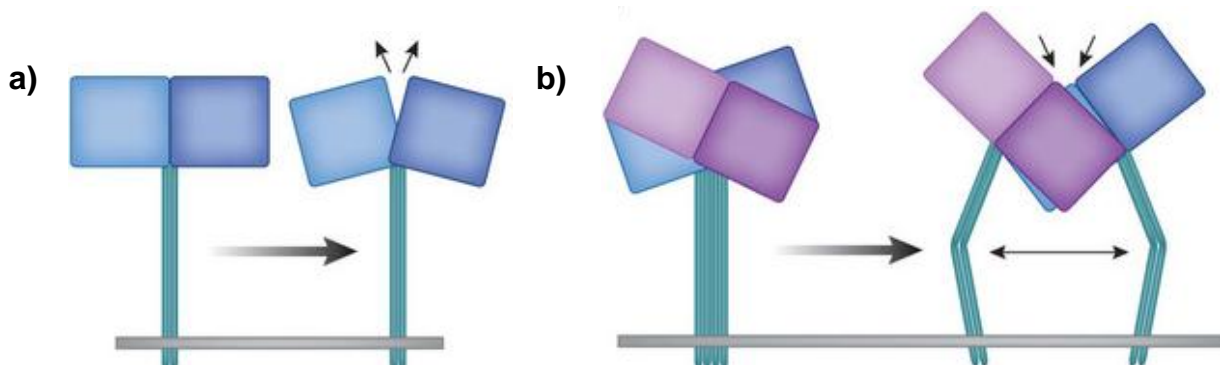


Abb. 6: Konformationsänderungen des H-Proteins nach Rezeptorbindung. (118)
 a) Modell nach Navaratnarajah *et al.* (91): Die C-terminalen Rezeptor-Bindedomänen eines H-Dimers verändern nach einer Rezeptorbindung ihre Position zueinander.
 b) Modell nach Hashiguchi *et al.* (48): Die H-Homodimere eines Tetramers verändern nach einer Rezeptorbindung ihre Position zueinander.

1.1.7. Wirtszellrezeptoren

Bisher sind drei Wirtszellrezeptoren identifiziert, mit denen H-Protein interagiert: das *membrane cofactor protein* (MCP, CD46), das *signalling lymphocyte-activation molecule* (SLAM, CD150) und Nectin-4.

Das humane CD46 wurde im Jahr 1993 als Rezeptor für laboradaptierte MV identifiziert (25, 89). Wildtyp-Viren binden nur sehr schwach oder gar nicht an CD46 (9). Dieser Rezeptor wird auf Zellen wie Granulozyten, Thrombozyten, T- und B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, Monozyten, hämopoetischen Zelllinien, Fibroblasten und malignen Zellen ubiquitär exprimiert (70, 79, 128). CD46 gehört zu den Regulatoren der *complement activation gene cluster* und schützt die Zellen vor einer Lyse durch das Komplementsystem (53, 70, 83). Der Rezeptor besteht aus vier kurzen N-terminalen Konsensus-Wiederholungssequenzen (*short consensus repeats*, SCR 1 – SCR 4), einer S-, T- und P-reichen Region, einer hydrophoben Transmembrandomäne, einem zytoplasmatischen Anker und einer zytoplasmatischen Domäne (70) (Abb. 7).

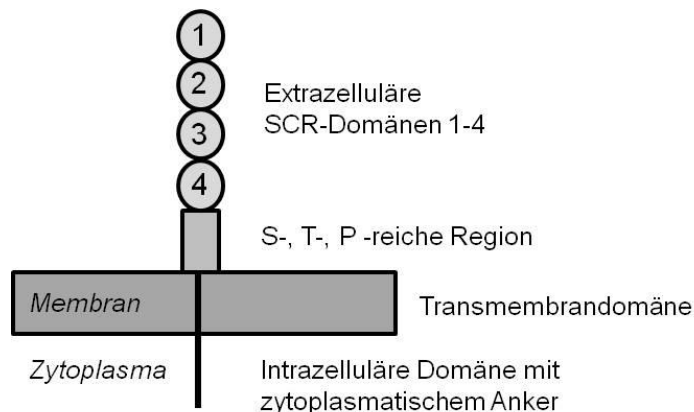


Abb. 7: Aufbau des Zellrezeptors CD46. (nach Dhiman *et al.*, Manchester *et al.* (24, 76))
 CD46 besitzt extrazellulär vier N-terminale Domänen (SCR 1-4) und eine S-, T- und P-reiche Region. Das Protein ist über eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert. Intrazellulär besitzt CD46 eine Domäne mit einem zytoplasmatischen Anker.

Alternative Spleißvorgänge generieren CD46 Isoformen unterschiedlicher Größe (51 – 58 kDa oder 59 – 68 kDa), die mit bis zu drei verschiedenen O-Glykanen modifiziert sein können (70, 71). Diese Modifikationen haben jedoch keinen Einfluss auf die Bindung der SCR1- und SCR2-Domäne an das H-Protein des MV (16, 71, 107). Das H-Protein interagiert hauptsächlich über AS des β 4- und β 5-Faltblattes der C-terminalen Rezeptor-Bindedomäne mit CD46 (78, 141). Die Interaktion zwischen

dem H-Protein laboradaptierter MV und CD46 führt zu einer verminderten Expression von CD46 auf der Zelloberfläche (65, 125). Die infizierte Zelle wird daraufhin lysiert und aus dem Organismus eliminiert.

Im Jahr 2000 wurde das Glykoprotein *signalling lymphocyte-activation molecule* (SLAM, CD150) als weiterer zellulärer Rezeptor des MV identifiziert (145). Sowohl laboradaptierte als auch Wildtyp-MV binden an dieses Typ-I Membranprotein (34, 145). SLAM (ca. 70 kDa) gehört zur *CD2 subset immunoglobulin gene superfamily* und wird vor allem von Zellen des Immunsystems (z. B. aktivierten T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen) exprimiert (10, 18, 24, 81, 148). Dieser Rezeptor ist an der Regulation der T-Zell-Antigenrezeptor induzierten Proliferation und Interferon- γ Produktion, B-Zellaktivierung und Zytokinproduktion von dendritischen Zellen beteiligt (10, 45, 148). SLAM besteht aus einer extrazellulären Region mit einer variablen (V) und einer konstanten (C2) Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne (24) (Abb. 8a). Der Rezeptor ist intrazellulär mit dem *SLAM associate protein* assoziiert (80, 123, 160). Das H-Protein bindet hauptsächlich über AS des β 5-Faltblattes der C-terminalen Rezeptor-Bindedomäne an die V-Domäne des Rezeptors (46, 48, 94) (Abb. 8b). Diese Interaktion bewirkt eine Verminderung der SLAM-Expression auf der Zelloberfläche und beeinflusst dadurch die Proliferation und Funktion humaner Lymphozyten (33, 144, 153).

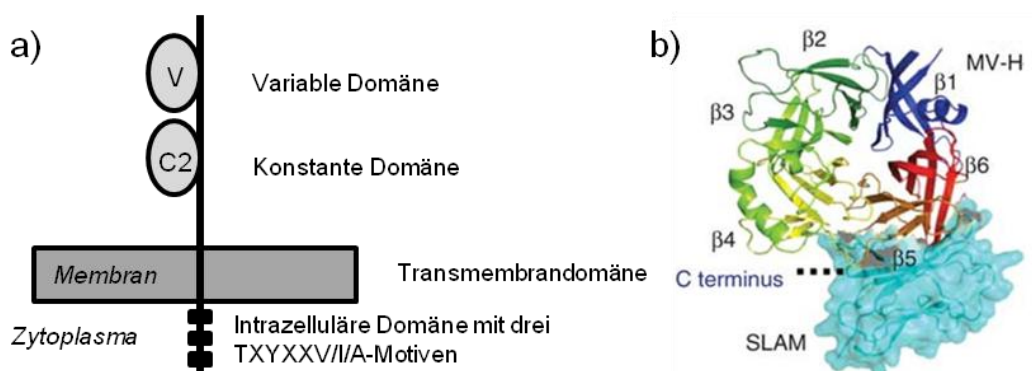


Abb. 8: Aufbau des Zellrezeptors SLAM und Interaktion mit dem H-Protein.

a) SLAM besitzt eine extrazelluläre variable (V) und konstante (C2) Domäne und ist über eine Transmembrandomäne in der Membran verankert. Die intrazelluläre Domäne enthält drei Threonin (T)-, Tyrosin (Y)-, Valin (V)-, Isoleucin (I)- und Alanin (A)-Motive (TXYXXV/I/A), die mit zellulären Proteinen interagieren. (Abb. nach Manchester *et al.* (76))

b) Der SLAM-Rezeptor (hellblau) interagiert hauptsächlich mit AS des β 5-Faltblattes des H-Proteins. (Abb. modifiziert nach Hashiguchi *et al.* (48))

Das MV kann neben Zellen des Immunsystems auch Epithelzellen und Zellen des Zentralen Nervensystems infizieren. Da diese Infektionen unabhängig von den Rezeptoren CD46 und SLAM verlaufen, wurde die Existenz eines weiteren Rezeptors für das MV postuliert (7, 49, 134, 142). *Microarray*-Analysen und funktionelle Experimente identifizierten im Jahr 2011 den Tumorzellmarker Nectin-4, auch als *polio receptor like gene* (PVRL4) beschrieben, als MV-Rezeptor auf Epithelzellen (85, 93). Nectin-4 ist eins von vier bekannten Nectinen, die zu den Ca^{2+} -abhängigen *immunoglobulin-like* (Ig-artige) *cell adhesion molecules* gehören und eine Reihe von zellulären Funktionen, wie Adhäsion, Migration und Polarisierung, regulieren (88, 104). Der Rezeptor besitzt eine extrazelluläre Region mit drei Ig-artigen Domänen (V, C2, Ig), eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne (14, 85, 104) (Abb. 9). Nach Infektion einer Zelle wird die Oberflächenexpression dieses Rezeptors ebenfalls vermindert (85, 93).

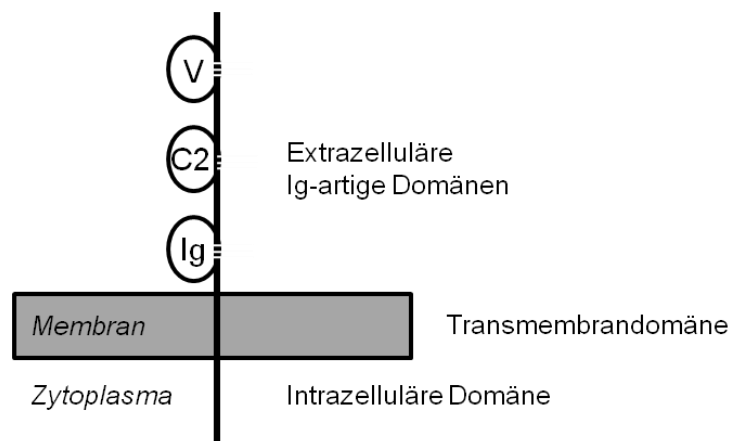


Abb. 9: Aufbau des Zellrezeptors Nectin-4. (nach Brancati *et al.* (14))

Nectin-4 besitzt drei extrazelluläre Ig-artige Domänen und ist über eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert. Die intrazelluläre Domäne interagiert mit zellulären Proteinen.

1.2. Die Immunantwort

1.2.1. Die angeborene und adaptive Immunantwort

Die Immunreaktion schützt den Organismus vor Pathogenen wie Viren, Bakterien, Pilzen oder Parasiten. Die Immunantwort wird in die angeborene und adaptive Immunantwort unterteilt. Faktoren des angeborenen Immunsystems erkennen Krankheitserreger anhand bestimmter konservierter Muster ihrer Oberflächenstrukturen. Das Zusammenspiel verschiedener Faktoren wie Phagozyten, Natürlichen Killerzellen und Granulozyten ermöglicht die initiale Bekämpfung des Pathogens bis die später zur Verfügung stehende adaptive Immunantwort bereit ist (87). Faktoren des adaptiven Immunsystems erkennen nach einer Anpassungs- und Reaktionsphase individuelle Oberflächenstrukturen von Krankheitserregern (87). Die Gene von B- und T-Lymphozyten kodieren eine hohe Anzahl an Rezeptoren, die an diese komplexen Oberflächenstrukturen (Antigene) binden können. Rezeptoren von B-Lymphozyten können native Antigene binden, wohingegen T-Zell-Rezeptoren Peptidfragmente der Antigene auf Antigen-präsentierenden Zellen erkennen. Die T-Lymphozyten werden in verschiedene Untergruppen unterteilt, die unterschiedliche Funktionen erfüllen um Pathogene abzutöten und aus dem Organismus zu eliminieren (87). Bestimmte T-Zellen können Botenstoffe sezernieren, welche die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten stimulieren (111). Ein Teil der ausdifferenzierten B-Lymphozyten, sogenannte Plasmazellen, sezernieren Antigen-bindende Rezeptoren, die als Antikörper (Ak) oder Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden. Ak gehören zu den humoralen Faktoren der Immunantwort, die Pathogene markieren und neutralisieren können (87). Das adaptive Immunsystem bildet außerdem Erreger-spezifische T- und B-Gedächtniszellen, die dem Organismus auch nach Elimination des Pathogens erhalten bleiben. Sie bilden das immunologische Gedächtnis, welches eine schnellere und effektivere Immunreaktion nach erneutem Pathogenkontakt ermöglicht (87).

1.2.2. Klassifikation und Eigenschaften von Antikörpern

Ak sind Bestandteil der adaptiven Immunabwehr und binden spezifisch an die Oberflächenstrukturen von Pathogenen. Ak werden in die Klassen IgA, IgE, IgD, IgM und IgG unterteilt (87). IgA sind in äußeren mukösen Sekreten (z. B. Mundschleimhaut) enthalten, da sie von Plasmazellen unterhalb des Schleimhautepithels gebildet werden. Sie stellen eine erste Barriere für viele Pathogene dar. IgE liegen gebunden auf Mastzellen vor. Nach Interaktion der IgE mit einem Antigen setzen die Mastzellen Granula mit pharmakologisch aktiven Molekülen frei. Die Funktion von IgD-Molekülen, welche auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert werden, ist unbekannt. IgM-Moleküle können sehr große Mengen an Antigen binden, da sie im Plasma als Pentamere vorliegen. Sie sind die ersten Ak, die von B-Lymphozyten als Reaktion auf ein Pathogen gebildet und sezerniert werden und tragen zur Elimination des Erregers bei (87).

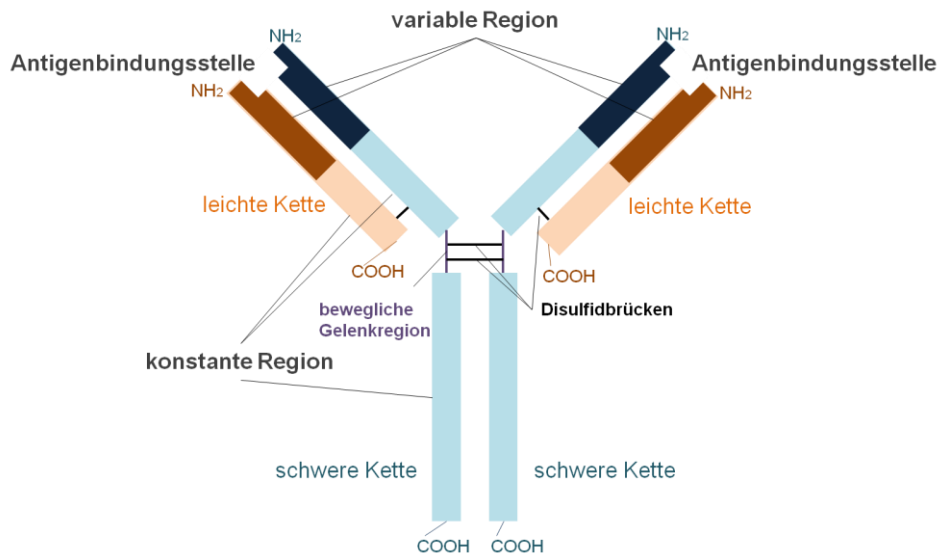


Abb. 10: Aufbau eines IgG-Moleküls.

IgG Moleküle bestehen aus zwei schweren (ca. 50 kDa) und zwei leichten (ca. 25 kDa) Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Ketten bestehen aus konstanten und variablen Regionen. Zwischen den schweren und leichten Ketten befindet sich in der variablen Region die Antigenbindestelle (Paratop). IgG besitzt zwei Antigenbindungsstellen.

Im Verlauf der ersten Reaktion auf ein Antigen findet ein Klassenwechsel in den IgM-produzierenden B-Lymphozyten statt. Anstatt IgM produzieren die B-Lymphozyten nun IgG, IgA bzw. IgE. Bei einem späteren zweiten Antigenkontakt bildet IgG den Hauptanteil der Ig im Serum (87) (Abb. 10). Auftretende somatische Hypermutationen in den Genen der Lymphozyten führen zu Punktmutationen in den variablen Ketten des IgG. Im Verlauf einer adaptiven Immunantwort wird so die Affinität der Ak zum Antigen fortwährend gesteigert. Die Affinität ist eine Maß für die

Stärke der monovalenten Bindung zwischen Antigen und Ak. Die Gesamtbindungsstärke multivalenter Ak-Antigen-Interaktionen wird als Avidität bezeichnet (87).

1.2.3. Die Rolle neutralisierender Antikörper innerhalb der MV-Immunität

Eine MV-Erstinfektion bzw. Masernimpfung induziert eine lang anhaltende Immunität. Dieser Schutz korreliert mit den durch die B-Zell-Antwort induzierten MV-neutralisierenden Ak (29). Die Mehrheit dieser neutralisierenden Serum-Ak binden an das virale H-Protein (22). Sie blockieren die Bindungsstelle des H-Proteins mit dem zellulären Rezeptor und/oder die Interaktion des H-Proteins mit dem F-Protein (40). Neutralisierende Ak, die an das F-Protein binden, können die Fusion zwischen der Zell- und Virusmembran verhindern (74, 99, 122). Ein weiteres Ziel neutralisierender Ak ist das M-Protein. Die Interaktion zwischen diesen Ak und dem M-Protein inhibiert die MV-Replikation (163).

1.2.4. Neutralisierende Epitope des H-Proteins

Die Interaktion zwischen Ak und Antigen beruht auf elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen (87). Proteine sind im Vergleich zu Polysacchariden stark immunogen. Ak können an lineare oder Konformationsepitope auf der Oberfläche eines Proteins binden. Lineare Epitope bestehen aus einer zusammenhängenden Folge von AS einer Peptidkette. Konformationsepitope, auch diskontinuierliche Epitope genannt, werden hingegen erst durch die räumliche Struktur, die ein Protein unter nativen Bedingungen einnimmt, ausgebildet (87). Die Seitenketten der AS bestimmen die Struktur, Ladung, den hydrophoben bzw. hydrophilen Charakter und die Reaktivität eines Peptides bzw. Epitopes (87) (Tab. 1).

Studien mit monoklonalen Antikörpern (mAk) zeigen, dass eine Bindung an bestimmte Bereiche der H-Proteinoberfläche zur Neutralisation des Virus führen kann (Tab. 2). Neutralisierende Epitope, wie das *hemagglutinin noose epitope* (HNE) oder *neutralizing epitope* (NE), wurden bereits umfangreich charakterisiert. Während das NE eine α -Helixstruktur besitzt (23), besteht das HNE aus einer amphiphilen Schleifenstruktur, in der eine Disulfidbrücke zwischen C386 und C394 eine wesentliche Rolle spielt (102, 164). Beide Epitope werden als Kandidaten für einen MV Peptid-Impfstoff diskutiert (31, 40, 164).

Tab. 1: Aminosäuren, ihre Abkürzung und Eigenschaft der Seitenkette (87)

Aminosäure (AS)	Abkürzung	Eigenschaft der Seitenkette
Glycin	G	neutral
Alanin	A	unpolar, hydrophob
Valin	V	aliphatisch, unpolar, hydrophob
Leucin	L	aliphatisch, unpolar, hydrophob
Isoleucin	I	aliphatisch, unpolar, hydrophob
Methionin	M	aliphatisch, unpolar, hydrophob
Prolin	P	zyklische Struktur, unpolar, hydrophob
Phenylalanin	F	aromatisch, unpolar, sehr hydrophob
Tyrosin	Y	aromatisch, polar, schwach hydrophob
Tryptophan	W	aromatisch, unpolar, schwach hydrophob
Serin	S	aliphatische Hydroxylgruppen, polar, neutral, hydrophil
Threonin	T	aliphatische Hydroxylgruppen, polar, neutral, hydrophil
Asparagin	N	polar, neutral
Glutamin	Q	polar, neutral
Cystein	C	Ausbildung von Disulfidbrücken C-C, polar, neutral
Lysin	K	stark polar, hydrophil, basisch
Arginin	R	stark polar, hydrophil, basisch
Histidin	H	aromatisch, basisch
Asparaginsäure	D	sauer
Glutaminsäure	E	sauer

Tab. 2: Neutralisierende mAk und ihr Bindungsbereich am H-Protein.

mAk	Bindungsbereich am H-Protein (AS-Position)	Referenzen
Mab 48	126-135	(73)
Mab I-44	185-195	(55, 72)
L77, NC32, K29, K71	195-203, 381-400	(68)
I-41, I-44, 7AG11	200-370	(129, 131, 132)
79-XV-V17	211-291	(56, 143)
BH47, BH59, BH129	240-255, NE: 244-250	(23, 40)
BH38	296-310	(13)
I-29	309-322	(55, 73)
BH216, BH6, BH21	HNE: 381-400	(164)
16-CD-11, 80-II-B2	541-505	(56, 67, 129)
BH26	521-617	(13)
Mab 18	587-596	(42, 72, 73)

1.3. Die Masernimpfung

1.3.1. Masernimpfviren

Die Mehrzahl der weltweit eingesetzten Impfstämme basiert auf einem vom späteren Nobelpreisträger John F. Enders und Thomas C. Peebles im Jahr 1954 erstmals auf Zellen angezüchteten und isolierten MV. Dieses MV wurde aus dem Blut des Erkrankten David Edmonston gewonnen und daher nach dem Patienten Edmonston (Edm) benannt (32). Zur Herstellung von Impfviren wurde das Virus Edm an verschiedene Zelllinien adaptiert und attenuiert (114) (Abb. 11). Häufig eingesetzte Vertreter der Impfviren sind AIK-C, Edmonston-Zagreb (EdmZ), Edmonston-Schwarz (EdmS), Edmonston B und Moraten (114).

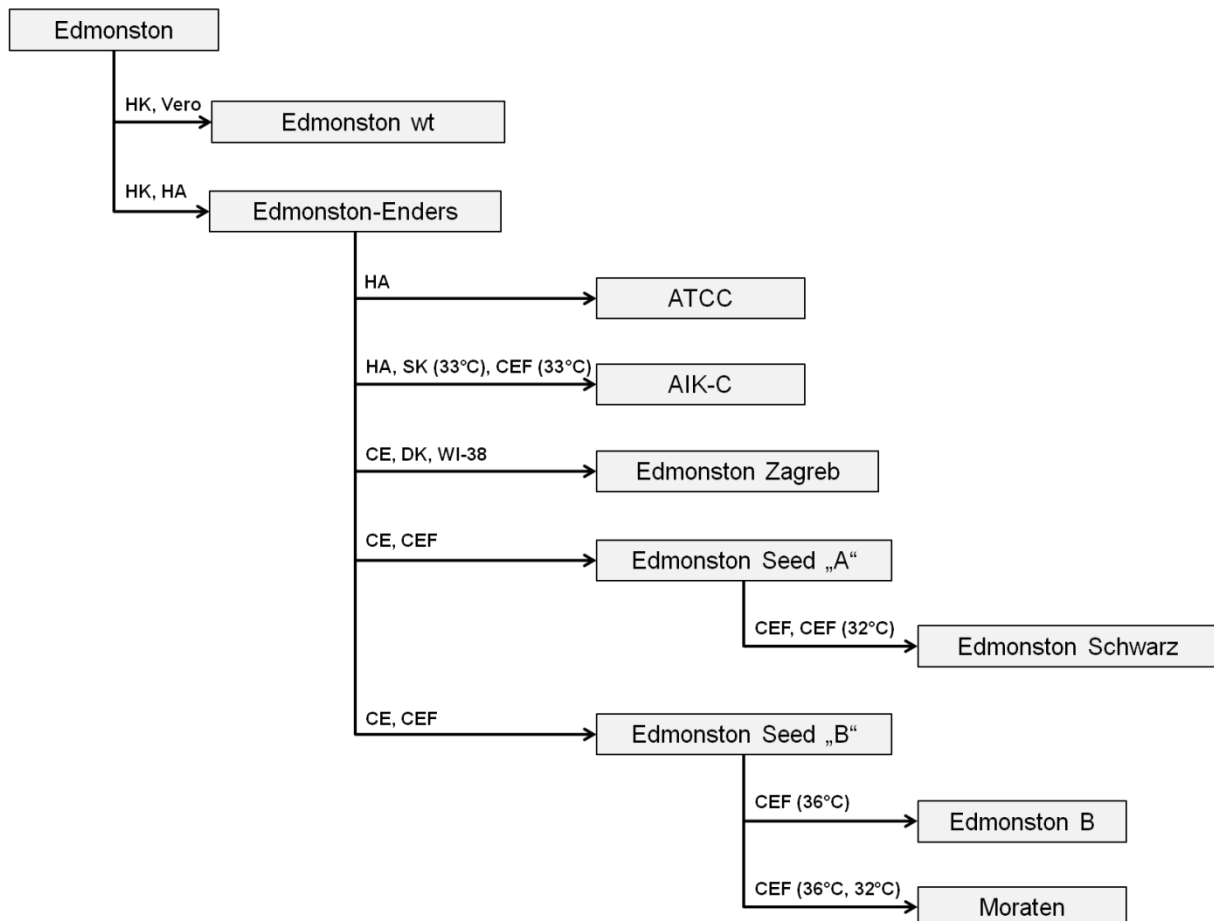


Abb. 11: Adaption des Edmonston Virus an verschiedene Zelllinien. (nach Rota *et al.* (114))

Das MV Edm wurde an folgende Zellen adaptiert: HK= humane Nierenzellen, HA= humane Amnionzellen, CE= Zellen der Amnionhöhle von Hühnerembryonen, CEF= Hühnerembryofibroblasten, DK= Nierenzellen des Hundes, WI-38= humane diploide Zellen, SK= Nierenzellen des Schafes. Die Kultivierungstemperatur betrug 37°C, sofern sie nicht anders angegeben wurde.

1.3.2. Impfpfehlungen und Impfquoten

Die Mitgliedstaaten von fünf der sechs Regionen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) haben sich die Elimination der Masern zum Ziel gesetzt (140). Die sechste WHO-Region, Südostasien, strebt lediglich eine Senkung der Masernmortalität um 95 % bis zum Jahr 2015 gegenüber dem Jahr 2000 an (156). Die Elimination der Masern in der WHO Region Europa soll bis zum Jahr 2015 erfolgen (2). Dies ist möglich, da der Mensch der einzige Wirt dieses Pathogens ist, eine Masernerkrankung labordiagnostisch nachweisbar und ein effektiver Impfstoff für die Bevölkerung zugänglich ist (26). Für Deutschland empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) eine erste Impfdosis im Alter von 11 Monaten. Eine zweite Impfung soll im 2. Lebensjahr erfolgen, um eventuell vorhandene Impflücken zu schließen (108). Die Masernimpfung wird in Kombination mit Impfstoffen gegen Mumps und Röteln (MMR) oder gegen Mumps, Röteln und Varizellen (MMRV) empfohlen, um die Gesamtzahl an Impfgaben möglichst gering zu halten (108).

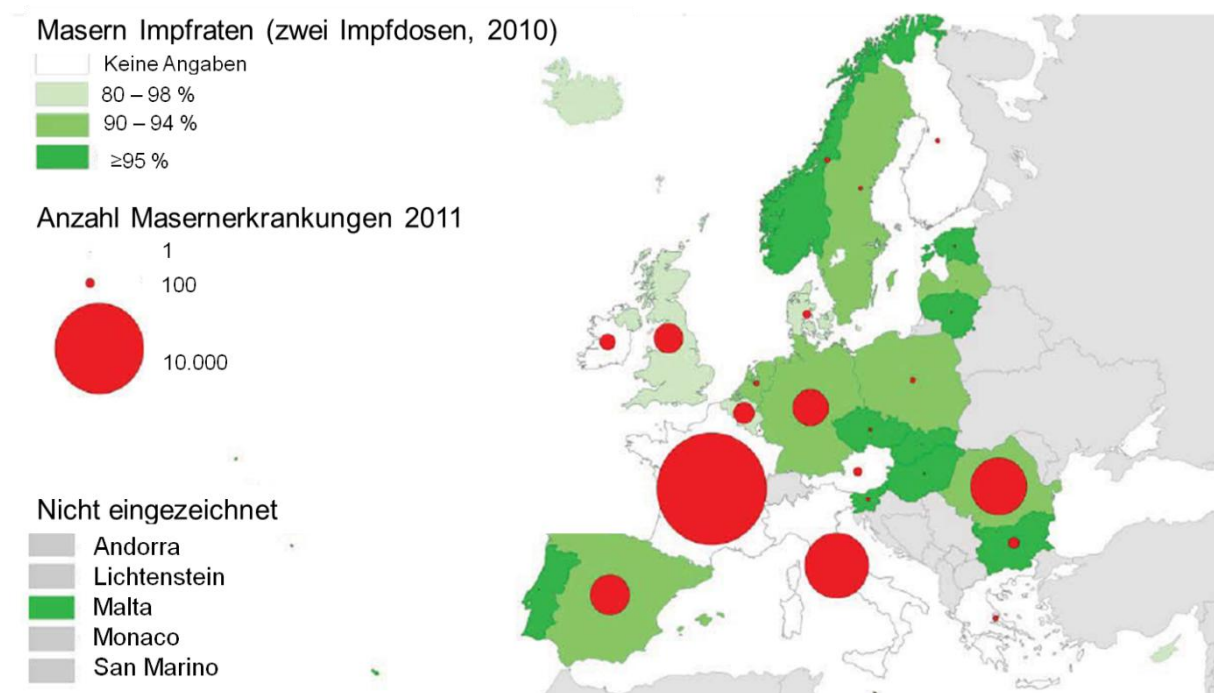


Abb. 12: Masern Impfraten und Anzahl der Masernerkrankungen in der europäischen Region. (modifiziert aus ECDC *Surveillance report 2012* (30))
Die Daten stellen die offiziell erfassten Zahlen des *The European Surveillance System (TESSy)* und *Centralized Information System for Infectious Diseases (CISID)* für *WHO/UNICEF Joint Reporting Form* und *WHO Regional Offices reports* dar.

Eine dauerhafte Unterbindung der Transmission des hoch kontagiösen und infektiösen MV erfordert eine sehr hohe Populationsimmunität. Die WHO hat daher eine Durchimpfungsrate von mindestens 95 % für beide Impfdosen als Ziel gesetzt (2). Dieses Ziel haben viele Länder Europas bisher noch nicht erreicht (30) (Abb. 12). Impfdaten aus Schuleingangsuntersuchungen im Jahr 2010 zeigen, dass 96,4 % der Kinder in Deutschland die erste Masernimpfung erhalten haben. Die Impfquote für zwei erhaltene Impfdosen betrug 91,5 % (109). Die Impfquote der Gesamtbevölkerung in Deutschland lag im Jahr 2010 bei 90 – 94 % für zwei Impfdosen (30) (Abb. 12). Deutschland hat das Ziel der WHO von einer Durchimpfungsrate ≥ 95 % für beide Impfdosen bisher noch nicht erreicht.

1.3.3. Maternale Antikörper

In Deutschland wird die erste Impfung im Alter von 11 Monaten empfohlen (108). Eine frühere Impfung ist mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer negativen Serokonversion assoziiert (98). Eine Ursache dafür können passiv erworbene maternale Ak sein, die den Säugling in den ersten Lebensmonaten vor einer MV-Infektion schützen und das Impfvirus neutralisieren (4). Die Konzentration der maternalen Ak nimmt in den ersten Lebensmonaten ab (60, 92, 136). Verschiedene Studien zeigen, dass Kinder vormals erkrankter Mütter über einen längeren Zeitraum einen höheren maternalen Ak-Titer gegen das MV besitzen, als Kinder geimpfter Mütter (15, 44, 162). Mit dem steigenden Anteil geimpfter Mütter in der Bevölkerung nimmt auch der Anteil der Kinder, die nach der Geburt nur wenige Monate durch passiv erworbene maternale Ak geschützt sind, zu. Da eine MV-Infektion im Säuglingsalter mit einem deutlich erhöhten Risiko für schwere Komplikationen verbunden ist, gibt es Ansätze für einen ergänzenden Impfstoff, der die Schutzlücke im 1. Lebensjahr schließen soll.

1.3.4. Alternative Ansätze in der Impfstoffentwicklung

Peptid-Impfstoffe werden bereits als Ergänzung zu den bisherigen Vollvirusimpfstoffen diskutiert (31, 40, 164). Die Peptide sollten möglichst thermostabil und so aufgebaut sein, dass sie nicht von passiv erworbenen maternalen Ak in Kleinkindern erkannt werden.

Eine neue Impfstoff-Generation sind kostengünstige DNA-Impfstoffe. Eine aufwändige Kühlkette ist im Gegensatz zum bisherigen Impfstoff nicht notwendig.

DNA-Impfstoffe gegen MV wurden bereits erfolgreich an Affen und Mäusen getestet (99, 135).

Eine Alternative zur herkömmlichen Impfstoffapplikation ist die Immunisierung durch ein Aerosol. Diese Impfstrategie ist auch für große Impfkampagnen geeignet, da sie kostengünstig ist und der Impfstoff einfach appliziert werden kann. Es werden keine Spritzen benötigt und der Impfstoff kann bei Raumtemperatur gelagert werden (146).

2. Problemstellung und Zielsetzung

Seit nahezu 50 Jahren werden attenuierte Masernimpfviren für eine Impfung eingesetzt. Das Virus ist bezüglich seiner antigenen Eigenschaften monotypisch und im Vergleich zu anderen RNA-Viren genetisch stabil. Epidemiologische Erfahrungen zeigen, dass die Impfung einen lang anhaltenden Schutz vor einer Infektion mit Wildtyp-MV induziert. Der Impfschutz korreliert mit der Impf-induzierten B-Zell-Antwort, deren Ergebnis MV-neutralisierende Ak sind. Diese Ak sind hauptsächlich gegen das Oberflächenglykoprotein Hämagglutinin (H) gerichtet. Auftretende Mutationen im H-Gen können zu einem Austausch von AS führen, welche die Antigenität des H-Proteins beeinflussen und zu Epitopverlusten führen können. Vergleichende Untersuchungen des H-Proteins von Impf- und Wildtyp-Viren haben gezeigt, dass sowohl zwischen Impf- und Wildtyp-Viren als auch innerhalb der Wildtyp-Viren Epitopverluste auftreten können (39, 117). Eine Akkumulation der Veränderungen antigenen Eigenschaften des MV erhöht das Risiko, dass eine Impfung mit bisher verwendeten Vakzinen in Zukunft nicht mehr vor einer MV-Infektion schützt.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung neutralisierender Epitope auf dem H-Protein aktueller Wildtyp-Viren im Vergleich zum Impfvirus. Dafür sollten zunächst Unterschiede in der AS-Sequenz des H-Proteins der Impf- und Wildtyp-Viren dargestellt werden. Anschließend sollten neutralisierende mAk gegen das Impfvirus EdmZ hergestellt, charakterisiert und ihre Epitope lokalisiert werden. Ein Vergleich der neutralisierenden Kapazität dieser mAk gegenüber den Impf- und Wildtyp-Viren gibt Aufschluss, welche Epitope auf dem H-Protein konserviert oder variabel sind. Desweiteren sollten die AS-Austausche im H-Protein von Wildtyp-Viren identifiziert werden, die für den Verlust eines von Impf-induzierten Ak erkannten neutralisierenden Epitopes verantwortlich sind. Entsprechend sollten Mutationsversuche mit rekombinanten H-Proteinen durchgeführt werden. Zusätzlich sollte gezeigt werden, inwieweit sich die neutralisierende Kapazität humaner Impf-induzierter Antiseren gegenüber Impf- und Wildtyp-Viren unterscheidet.

Die Ergebnisse der Analyse neutralisierender Epitope auf dem H-Protein tragen zur Risikobewertung eines möglichen Wirksamkeitsverlustes der etablierten Impfstoffe bei.

3. Materialien

Geräte und Verbrauchsmittel

<i>3500xl Dx Genetic Analyzer</i>	Applied Biosystems, U.S.A.
Agarosegelelektrophorese-Kammer	Biometra, D
ÄKTA-Chromatographieanlage ÄKTA-Explorer	GE Amersham Pharmacia Biotech, S
Brutschrank	Heraeus, D; Binder, D
Bakterienschüttler Certomat®	R. B. Braun Biotech International, D
Cryoröhrchen	Nunc, DK
Deckgläschen	Carl ROTH, D
Dialyseschläuche, high retention seamless cellulose tubing	Sigma-Aldrich, D
Einfrierbox	Carl ROTH, D
FACS Calibur™	BD Biosciences, U.S.A.
<i>Fast-Blot „semi-dry“-Apparatus</i>	Biometra, D
Feinwaage	Sartorius, D
Filterpapier	Bio-Rad, D
<i>FLUOstar Omega Reader</i>	BMG Labtech GmbH, D
Fotodokumentationssystem	Intas, D
GenePix 4000B	Molecular Devices, U.S.A.
Glaspipetten: 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Brand, D
Glas-Kolben, -Messzylinder, -Bechergläser	Schott, D
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch, D; Liebherr, D; Heraeus, D
Lumi-Film	Roche, D
MALDI-TOF Autoflex™ Massenspektrometer	Bruker Daltonics GmbH, D
Magnetrührer	Jahnke und Künkel, D
Mikrotiterplatten für ELISA: -Anti-Masern ELISA IgG (MV-Mikrotiterplatte) -Mikrotiterplatte ohne Antigen	EUROIMMUN, D
Mikroskope: konfokales Laser Raster Mikroskop 510 (cLSM) Inverted Microscope Axiovert 200M	Carl Zeiss, D Carl Zeiss, D
<i>Mini-PROTEAN II multiscreen apparatus</i>	Bio-Rad, D
<i>MTP 384 Stahltarget T F, poliert</i>	Bruker Daltonics GmbH, D
<i>NanoDrop Spectrophotometer 3000, 8000v2.2.1</i>	Thermo Fisher Scientific, U.S.A.
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, D
Objektträger	Carl ROTH, D
<i>PepStar™ Peptide Microarray</i>	JPT Peptide Technologies, D
Petrischalen	Sarstedt, D
pH-Messgerät	Beckmann, U.S.A.

Materialien

Pipettboy	Integra Biosciences, D
Pipetten	Gilson, U.S.A.; Eppendorf, D; Thermo Scientific, U.S.A.
Pipettenspitzen	Molecular BioProducts, U.S.A.; Süd Laborbedarf, D; Eppendorf, D; Thermo Scientific, U.S.A.
Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran, Immobilion	Millipore, D
Reaktionsgefäße: 0,1 ml – 50 ml	Applied Biosystems, U.S.A.; Eppendorf, D; Greiner, D; Nunc, DK; TPP, CH
Röntgenfilm-Entwickler Curix 60	AGFA, U.S.A.
Schüttler	Biometra, D
SDS-Gelelektrophoresekammer	BioRad
Spannungsgeräte	Biometra, D
Spritzen und Kanülen	Braun, D
Sterilfilter: 0,22 µm, 0,45 µm	Corning, U.S.A.; Carl ROTH, D
Stickstofftruhe, Isothermal V-1500 series	Custom BioGenic Systems, U.S.A.
<i>Thermocycler</i>	Biometra, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, D
Ultraschallgerät: Sonifier 450	Ultraschall- und Labortechnik Heinemann, D
Vakuumpumpe	Integra Biosciences, D
Verschlussklammern	Carl ROTH, D
Vortex GFL	Jahnke und Künkel, D
Wasserbad	Haake, D; Julabo, D
Zellkulturgefäße: Schalen, Flaschen, Platten	Nunc, D; Sarstedt, D; TPP, CH
Zellsiebe: 70 µm, 212 µm	Carl ROTH, D
Zentrifugen:	
-Biofuge Fresco, Biofuge Stratos	Heraeus, D
-Kühlzentrifuge Sorvall® RC 5C Plus	Thermo Fisher, D
-Ultrazentrifuge Optima L100K	Beckman Coulter, D
Zentrifugengefäße: 15 ml, 50 ml	TPP, CH; DuPont NEN, U.S.A.; Kontron Instruments, GBR
- <i>Ultra Clear™</i>	Beckman, U.S.A.
Zentrifugenrotoren	
-SW 32Ti	Beckman, U.S.A.
-SLA1500, SS34	Thermo Scientific, U.S.A.
<i>ZipTip®</i> -Spitzen, C18 Phase	Millipore, D

Chemikalien, Reagenzien

1,4-Dithiothreit, 0,4 M	Merck, D
2-Hydroxypropan-1,2,3-ricarboxylsäure (C ₆ H ₈ O ₇)	Fluka Sigma-Aldrich, D
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB): -recomBlot für Colorimetrischen Immunoassay -Tabletten für ELISA	Mikrogen Diagnostik, D Sigma-Aldrich, D
4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Carl ROTH, D
α-Hydroxycyanozimsäure	Bruker Daltonic, D
β-Mercaptoethanol	Carl ROTH, D
β-Propiolacton	Ferak, D
Acetonitril	Merck, D
Acrylamid bis-Acrylamid, 30 %	Sigma-Aldrich, D
Agar	Carl ROTH, D
Agarose	Invitrogen, D
Albumin Fraktion V, Protease frei (BSA)	Carl ROTH, D
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, D
Ammoniumhydrogencarbonat (NH ₄ HCO ₃)	Sigma-Aldrich, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, D
Ammoniumthiocyanat (NH ₄ SCN)	Sigma-Aldrich, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, U.S.A.
Azaserine-Hypoxanthine 50x	Sigma-Aldrich, D
Bovines Serum Albumin, 30% (BSA, 30 %)	PAA, AUS
Bromphenolblau	Serva, D
Carboxymethylcellulose Natriumsalz (CMC)	Fluka Sigma-Aldrich, D
Desoxyribonukleotide dNTP, 10 mM	QIAGEN, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl ROTH, D
Di-Natriumphosphat hepta-hydrat (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	Sigma-Aldrich, D
Di-Natriumphosphat di-hydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, D
Dithiothreitol, 0,1 M (DTT)	Invitrogen, U.S.A.
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, D
Formaldehyd	Carl ROTH, D
Fötale Kälberserum (FKS) -FKS für eukaryotische Zellen (Ausnahme: Hybridomzellen) -FKS für Hybridomzellen	PAA, AUS Invitrogen, U.S.A.
Freund-Adjuvans, komplett und unvollständig	Sigma-Aldrich, D
<i>GelRed^{IM} Nucleic Acid Gel Stain</i>	Biotium, U.S.A.
Glycerin	Carl, ROTH, D
Glycin	Carl, ROTH, D
IGEPAL (NP 40)	Fluka Sigma-Aldrich, D
Iodacetamid, 0,5 M	Sigma-Aldrich, D

Materialien

Kaliumdihydrogenorthophosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, D
Kulturmedien für Zellen: -DMEM, EMEM, MEM- α , RPMI, 10x MEM	- Gibco, U.S.A. Sigma-Aldrich, D
L-Glutamin, 200 mM	PAA, AUS
Luminol	Sigma, D
Magermilchpulver	Sucofin, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, D
Methanol	Carl ROTH, D
Mono-Natriumphosphat mono-hydrat (NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O)	Sigma-Aldrich, D
Mowiol	Calbiochem, U.S.A.
Natriumazid (NaN ₃)	Carl ROTH, D
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Carl ROTH, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl ROTH, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl ROTH, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl ROTH, D
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, D
Paraformaldehyd (PFA)	Carl ROTH, D
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich, D
Penicillin/Streptomycin, 100x (P/S)	PAA, AUS
Polyethylen Glykol (PEG) 1500	Roche, D
Polyethylenimine (PEI)	Sigma-Aldrich, D
Protease Inhibitor, Complete Mini	Roche, D
Protein G - <i>HiTrap</i> TM Protein G HP 1ml -Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, D GE Healthcare, D
Proteinmarker / Kalibrierungspeptide: -PageRuler TM Plus Prestained Protein Ladder, -PageRuler TM Prestained Protein Ladder, -Peptide Calibration Standard II	Thermo Fisher Scientific, U.S.A. Thermo Fisher Scientific, U.S.A. Bruker Daltonic, D
Recombinant Mouse Interleukin-6 (IL-6) <i>Roti</i> [®] -Blue	Invitrogen, U.S.A. Carl ROTH, D
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, D
Saponin	Sigma-Aldrich, D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl ROTH, D
Sucrose, Saccharose	Carl ROTH, D
Trifluoressigsäure	Merck, D
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl ROTH, D
TritonX-100	Merck, D
Türks Lösung	Merck, D
Tween20	Carl ROTH, D

Materialien

Wasser	
-Bidestilliertes Wasser (H ₂ O)	Fluka Sigma-Aldrich, D
-HPLC-Wasser (HPLC-H ₂ O)	Fluka Sigma-Aldrich, D
-DEPC behandeltes Wasser (PCR-H ₂ O)	ROTH, D
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl ROTH, D

Kits

<i>ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit</i>	Applied Biosystems, U.S.A.
<i>IsoStrip^{IM} Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit</i>	Roche, U.S.A.
<i>NucleoBond[®]Xtra Maxi Kit</i>	Macherey-Nagel, D
<i>QIAmp Viral RNA Mini Kit</i>	QIAGEN, D
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	QIAGEN, D
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	QIAGEN, D
<i>QIAquick Gel Extraction (and PCR Purification) Kit</i>	QIAGEN, D
<i>RNase free DNase Set</i>	QIAGEN, D
<i>Z-competent E.coli Transformation Kit and Buffer Set</i>	ZYMO Research, U.S.A.

Enzyme und Reaktionspuffer

Dpn1 (20.000 U/ml)		New England Biolabs, U.S.A.
EcoR1 (20.000 U/ml)	10 x EcoR1-Puffer	New England Biolabs, U.S.A.
T4 DNA Ligase (400.000 U/ml)	10 x T4 DNA Ligase-Puffer	New England Biolabs, U.S.A.
Not1 (10.000 U/ml)		New England Biolabs, U.S.A.
Pfu Ultra ^{IM} HF DNA Polymerase (2,5 U/μl)	10 x Pfu Ultra ^{IM} HF Reaction Buffer	Agilent Stratagene, U.S.A.
Phusion [®] Hot Start DNA Polymerase (2 U/μl)	5 x Phusion [®] HF Reaction Buffer	Thermo Scientific, FIN
RNasin [®] RNase (40 U/μl)		Promega, U.S.A.
SuperScript [®] III Reverse Transcriptase (200 U/μl)	5 x First Strand Buffer	Invitrogen, U.S.A.
Trypsin		Sigma-Aldrich, D
0,5 % Trypsin-EDTA		Gibco, U.S.A.

Plasmide

pcDNA3.1 (+)	Invitrogen, U.S.A.
pcDNA_MV-H_EdmZ (Insert: H-Gen des EdmZ)	Finsterbusch <i>et al.</i> (39)

Antikörper

<i>Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)</i>	Invitrogen, U.S.A.
BH17, BH47, BH195, BH216	RIVM, Bilthoven; Institut für Immunologie, Luxembourg
<i>Cy⁵5-conjugated AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)</i>	Dianova, D
<i>Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcγ Fragment Specific</i>	Dianova, D
<i>Goat Anti-Mouse IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugate</i>	Invitrogen, U.S.A.
Maus-Gammaglobulin	Dianova, D
<i>Monoclonal Antibody MAB 8906</i>	Millipore, U.S.A.
<i>Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)</i>	Dianova, D

Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Metabion hergestellt. Vorwärts-Primer sind mit „s“ (*sense*) und Rückwärts-Primer mit „as“ (*antisense*) gekennzeichnet. Die lyophilisierte Primer wurden in HPLC-H₂O gelöst und auf 100 µM eingestellt.

Primer zur Amplifikation und Sequenzierung des H-Gens:

Primer	Nukleotidsequenz 5'→3'
MaH1s	CCTCTGGCCGAACAATATCG
MaH5s	TTCCCTATCAGGGATCAGGG
MaH9s	GCAGCCATCTACACCGCAGAG
MaH12as	CATGTGAAGCATTCCAC
MaH13s	GCATGGGAGTCAGCTGC
MaH14s	GCTCCGGTGTTCCATATG
MaH15as	GAGTGGTGTCAGCACGTCC
3291s	AGGTCAATTCTCAAACATGTCTG
3292as	GAAGCAATTTTGATTTTAAGCTCA
3374s	GTCATCAAGCAACCACCGCATCCA
3375as	TTGACGGATAGCGAGTCCATAACGGG
3376s	AATATGTTGCTGCAGGGGGCGTTG
3377as	AGGCGGTGCTTGATGTTCTGACACAG

Klonierungsprimer: Primer mit einer Sequenz für Schnittstellen der Enzyme *Eco*R1 (s-Primer) bzw. *Not*I (as-Primer) am 5'-Ende:

Primer	Nukleotidsequenz 5'→3'
Ma105as	AGGGCGGCCGCCTATCTGCGGCTGGTTCCATCTTC
3270s	CGGAATTCGGATGTCACCCCAACGAGACCGGAT
3271as	AGGGCGGCCGCCTATCTGCGGTTGGTACCATCTTC
3302s	CGGAATTCGGATGTCACCGCAACGAGACCGGAT
3303as	AGGGCGGCCGCCTATCTGCGGTTTGTTCATCTTC
3304s	CGGAATTCGGATGTCACCACAACGAGACCGGAT
3305as	AGGGCGGCCGCCTATCCGCGATTGGTTCCATCTTC

Mutagenese-Primer: Primer zur Mutagenese des H-Gens in Plasmiden:

Primer	Nukleotidsequenz 5'→3'
3318s	GTCAGAGTTGTCACAACCAAGCATGC
3319as	GCATGCTTGGTTGTGACAACTCTGAC
3320s	AGTTGCCCAACTGAGCATGCACCG
3321as	CGGTGCATGCTCAGTTGTGGCAACT
3322s	GTCAGAGTTGTCACA ACTGAGCATGCACCG
3323as	CGGTGCATGCTCAGTTGTGACAACTCTGAC
3328s	GTCAGAGTTGCCCAACTGAGCATG
3329as	CATGCTCAGTTGTGGCAACTCTGAC
3334s	CAGCAAGCGTGTAGGGTAAAATCC
3335as	GGATTTTACCCCTACACGCTTGCTG
3336s	CAACAGGCGTGTAGGGTAAAATCC
3337as	GGATTTTACCCCTACACGCTGTTG
3338s	CAGCAGGCGTGTAAAGGGTAAAATCC
3339as	GGATTTTACCCCTACACGCTGCTG
3342s	AGTTGTCACAACCAAGCATGTACCG
3343as	CGGTACATGCTTGGTTGTGACAACT
3344s	AGTTGTCACAACCGAGCATGTACCG
3345as	CGGTACATGCTCGGTTGTGACAACT
3346s	GTCAGAGTTGCCACAACCAAGCATGTACCG
3347as	CGGTACATGCTTGGTTGTGGCAACTCTGAC
3354s	AGTTGTCACA ACTGAGCATGCACCG
3355as	CGGTGCATGCTCAGTTGTGACAACT
3368s	CTATCAGGGATTAGGGAAAGGTG
3369as	CACCTTTCCCTAATCCCTGATAG
3370s	CTATCAGGGATCACGGAAAGGTG
3371as	CACCTTTCCGTGATCCCTGATAG

Masernviren

Edm Zagreb (EdmZ) Genotyp A	Robert Koch-Institut, FG12
Edm Schwarz (EdmS) Genotyp A	Robert Koch-Institut, FG12
MVi/Maryland.USA/0.54 Genotyp A	Food and Drug Administration FDA, U.S.A.
MVi/Tuebingen.DEU/24.00 Genotyp C2	Robert Koch-Institut, FG12
MVi/Berlin.DEU/11.10 Genotyp B3	Robert Koch-Institut, FG12
MVi/Duisburg.DEU/10.09 Genotyp D4	Robert Koch-Institut, FG12
MVi/Berlin.DEU/04.08 Genotyp D5	Robert Koch-Institut, FG12
MVi/Berlin.DEU/47.00 Genotyp D6	Robert Koch-Institut, FG12
MVi/Duesseldorf.DEU/10.00 Genotyp D7	Robert Koch-Institut, FG12
MVi/Essen.DEU/12.10 Genotyp D8	Robert Koch-Institut, FG12
MVi/Berlin.DEU/10.10 Genotyp D8	Robert Koch-Institut, FG12
MVi/Sofia.BGR/19.05 Genotyp H1	Robert Koch-Institut, FG12
MVi/Berlin.DEU/44.01 Genotyp H1	Robert Koch-Institut, FG12

Zelllinien

Calu-3 Humane Epithelzelllinie aus einem Lungen-Adenokarzinom, exprimiert Nectin-4 (86, 93)	American Type Culture Collection (ATCC), U.S.A.
CHO-SLAM Stabil mit humanen SLAM-Rezeptor transfizierte Chinesischer Hamster Ovarienzelllinie (33)	Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg
HEK-293G Humane Epithelzelllinie aus der Niere	Robert Koch-Institut, FG12
Hybridomzellen Fusionierte Zellen aus Myelomazellen und B-Lymphozyten	Hergestellt in dieser Arbeit
P3x63Ag8.653 Maus-Myelomazelllinie zur Herstellung von Hybridomzellen, produziert keine IgG-Ketten (59)	Robert Koch-Institut, FG12
Vero Zelllinie aus der Niere des Cercopithecus aethiops, exprimiert CD46 (25, 89, 90)	American Type Culture Collection (ATCC), U.S.A.
Vero/hSLAM Stabil mit hSLAM-Rezeptor transfizierte Vero-Zelllinie (94)	WHO Global Measles Rubella Laboratory Network

Materialien

Zellkulturmedien

<u>Zelllinie</u>	<u>Wachstumsmedium</u>	<u>Erhaltungsmedium</u>
Calu-3	10 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin in EMEM	2 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin in EMEM
CHO-SLAM	10 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin in MEM- α	2 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin in MEM- α
HEK-293G	5 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin in DMEM	
Hybridomzellen	R10F: 10 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin, 50 μ M β -Mercaptoethanol, 50 U/ml IL-6 in RPMI 1640 R20F: 20 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin, 50 μ M β -Mercaptoethanol, 50 U/ml IL-6 in RPMI 1640 Selektionsmedium: R20F-Medium mit 1x Azaserine- Hypoxanthine	
P3x63Ag8.653	10 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin, 50 μ M β -Mercaptoethanol in RPMI 1640	
Vero	5 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin in E-MEM	2 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin in E-MEM
Vero/hSLAM	5 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin in DMEM	2 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin in DMEM

Das FKS wurde vor dem Einsatz 30 min bei 56 °C inaktiviert.

Bakterien

Escherichia coli, Stamm DH5 α

Robert Koch-Institut, FG12

Medium für Bakterien

Escherichia coli
Stamm DH5 α

LB-Medium:
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l Trypton
10 g/l NaCl
pH 7,5

LB-Agar-Medium:
LB-Medium mit 1,5 % Agar

Versuchstiere

8 Balb/c-Mäuse (6 – 10 Wochen alt)

Zentrale Versuchstierzucht
Bundesinstitut für Risikobewertung
Berlin

Die Haltung und Pflege der Mäuse erfolgte in der Tierversuchsanlage des Robert Koch-Institutes, Berlin. Die Manipulationen am Tier wurden vom Personal der Tierversuchsanlage durchgeführt und erfolgten unter der Verantwortung von Dr. Sebastian Voigt und Dr. Brigitte Dorner, Robert Koch-Institut, Berlin.

Puffer und Lösungen

Blockpuffer I	0,1 % Tween20, 1 % FKS, 2 % BSA (30 %) in PBS
Blockpuffer II	2,5 % FKS, 0,1 % NaN_3 in PBS
Blockpuffer III	0,05 % Tween20, 5 % Magermilchpulver in PBS
Blockpuffer IV	0,05 % Tween20, 1 % BSA in PBS
Blockpuffer V	0,05 % Tween20, 0,5 % Magermilchpulver in PBS
Casein Diluent Puffer	Senova, D
CMC-Overlay	0,5 % CMC, 6 % 10xMEM, 3 % FKS, 1 % P/S, 0,17 % NaHCO_3 in MEM- α (CHO-SLAM) oder E-MEM (Calu-3, Vero) oder DMEM (Vero/hSLAM)
DNA-Probenpuffer	70%ige Sucrose in Bromphenolblau
Detektionslösung	Lösung A: 50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris pH 8,6 Lösung B: 30 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 27 ml DMSO Detektionslösung: 1 ml Lösung A + 100 μl Lösung B + 0,3 μl H_2O_2
Dialysepuffer	1 mM EDTA, 240 mM NaHCO_3 in H_2O
Elutionspuffer	100 mM Glycin in H_2O pH 2,7
Erythrozyten-Lyse-Lösung	Lösung A: 1,1 % NH_4Cl in H_2O Lösung B: 0,17 M Tris in H_2O pH 7,2 Erythrozyten-Lyse-Lösung: Lösung A : Lösung B= 9 : 1
HCCA-Matrix	Lösung A: 12 g/ml α -Hydroxycyanozimtsäure in Acetonitril Lösung B: HPLC-Wasser HCCA-Matrix: Lösung A : Lösung B= 2 : 1 in 0,1 % Trifluoressigsäure
Lysispuffer	150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 20 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 % NP40, 1x Protease Inhibitor in H_2O
Neutralisationspuffer	2 M Tris in H_2O pH 8
NTE-Puffer	10 mM Tris, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8 in H_2O pH 7,4
PBS	10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 2 mM KCl in H_2O pH 7,2
Phosphat-Citrat-Puffer	Lösung A: 1,92 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ in 100 ml H_2O Lösung B: 3,56 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml H_2O Phosphat-Citrat-Puffer: Lösung A : Lösung B : H_2O = 1 : 1,06 : 2,06

Materialien

Phosphatpuffer	Lösung A: 53,62 g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O gelöst in H ₂ O (V= 1 l) Lösung B: 27,6 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O gelöst in H ₂ O (V= 1 l) Phosphatpuffer: Lösung A : Lösung B : H ₂ O= 1 : 7,1 : 8,1
<i>Roti@-Load1</i> , reduzierender Proteinpuffer	Carl ROTH, D
<i>Roti@-Load2</i> , nicht-reduzierender Proteinpuffer	Carl ROTH, D
Sammelgelpuffer	1 M Tris in H ₂ O pH 6,8
Saponinpuffer	5 % Saponin in PBS
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS in H ₂ O
Sucroselösungen	25 %, 54 %, 60 % Sucrose in NTE-Puffer
<i>SuperBlock™ T20 TBS Blocking Puffer</i>	Thermo Fisher Scientific, U.S.A.
TAE-Puffer (10x)	Invitrogen, U.S.A.
TBS	50 mM Tris, 150 mM NaCl, in H ₂ O pH 7,5
TMB-Substrat-Lösung	1 Tablette 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) gelöst in 10 ml Phosphat-Citrat-Puffer mit 2 µl H ₂ O ₂
Transferpuffer	Methanol : SDS-Laufpuffer : H ₂ O= 1 : 3 : 5
Trenngelpuffer	1,5 M Tris in H ₂ O pH 8,8
Tris-Puffer	50 mM Tris in H ₂ O pH 8,5
Trypsinpuffer	40 mM NH ₄ HCO ₃ in 9 % Acetonitril
Trypsinlösung	20 µg/ml Trypsin in Trypsinpuffer
Verdünnungspuffer	0,05 % Tween20, 0,5 % Magermilchpulver in PBS pH 7,2
Waschpuffer I	0,1 % Tween20 in PBS
Waschpuffer II	0,05 % Tween20 in PBS
Waschpuffer III	0,2 % NP40, 1x Protease Inhibitor in PBS
Waschpuffer IV	1 % P/S in PBS

Software

<i>CellQuest Pro</i>	BD Biosciences, U.S.A.
<i>flexAnalysis 2.4</i>	Bruker Daltonics, D
<i>flexControl 3.1</i>	Bruker Daltonics, D
<i>Geneious 5.4</i>	Biomatters, NZ
<i>GenePix Pro 6.1</i>	Molecular Devices, U.S.A.
<i>Lasergene 8.0 DNASTar</i>	DNASTar Madison, U.S.A.
<i>LSM Image Browser 4.2, LSM 510</i>	Carl Zeiss MicroImaging, D
<i>MacVector 12.0.6</i>	MacVector Inc., UK
<i>MS Office 2003/2007/2010</i>	Microsoft, U.S.A.

4. Methoden

4.1. Zellbiologische Methoden

4.1.1. Kultivierung von Zellen

Die eingesetzten Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen oder -platten kultiviert. Zur Passage der adhärennten Zelllinien CHO-SLAM, Vero, Vero/hSLAM, HEK-293G und Calu-3 wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch eine kurze Inkubation mit 0,5 % Trypsin-EDTA bei 37 °C von der Gefäßwand gelöst. Nach Resuspension und Verdünnung wurden die Zellen in frischem Wachstumsmedium in neue Zellkulturgefäße pipettiert. Vero Zellen wurden einmal im Verhältnis 1:5 pro Woche umgesetzt, HEK-293G Zellen und CHO-SLAM zweimal 1:5, Vero/hSLAM Zellen zweimal 1:10 und Calu-3 Zellen zweimal 1:3. Die Myelomzelllinie P3x63Ag8.653 und die in dieser Arbeit hergestellten Hybridomzelllinien sind Suspensionszellen. Diese Zellen wurden je nach Wachstum alle ein bis zwei Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:3 mit frischem Wachstumsmedium bzw. R10F-Medium verdünnt.

4.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für eine Langzeitkonservierung wurden die Zellen eingefroren. Dafür wurden die adhärennten Zellen zunächst von der Zellkulturflasche abtrypsinisiert und in Wachstumsmedium aufgenommen. Die Suspension der adhärennten Zellen bzw. die Suspensionszellen wurden jeweils für 8 min bei 380 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium mit 40 % FKS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Aliquots dieser Zellsuspension wurden in Cryoröhrchen aufgenommen und in einer Einfrierbox langsam (- 1 °C/min) auf -80 °C gekühlt. Nach ein bis zwei Tagen wurden sie in eine Stickstofftruhe mit flüssigem Stickstoff überführt und dort gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch zügiges Erwärmen der Cryoröhrchen auf 37 °C in einem Wasserbad. Die Zellen wurden mit frischem Wachstumsmedium in Zellkulturflaschen bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Zur Entfernung des DMSO aus der Zellsuspension wurde das Wachstumsmedium nach ca. 4 h ausgetauscht.

4.1.3. Transfektion von Zellen

Für die ektopische Expression eines Proteins wurden Zellen mit einem Expressionsplasmid, welches das Gen des gewünschten Proteins enthielt, transfiziert. Dazu wurden HEK-293G Zellen in 24-Lochplatten ausgesät ($1,8 \times 10^5$ Zellen/Vertiefung) und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Für die Transfektion wurde 1 µg Plasmid-DNA in 62,5 µl DMEM aufgenommen. Anschließend wurden 62,5 µl Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI, c= 10 µg/µl in DMEM) zugegeben. Die Suspension wurde durchmischt und für 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. In dieser Zeit bilden PEI und DNA einen kondensierten Komplex, der von Zellen aufgenommen werden kann. Nach Absaugen des Zellmediums wurden 500 µl frisches Wachstumsmedium je Vertiefung zugegeben und der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 5 h bei 37 °C im Brutschrank kultiviert und das Medium gegen 500 µl frisches Wachstumsmedium ausgetauscht. Die Zellen anschließend wurden über Nacht im Brutschrank kultiviert.

4.2. Virologische Methoden

4.2.1. Anzucht von Masernviren

Die Anzucht von MV erfolgte auf Vero/hSLAM Zellen. Einen Tag nach dem Aussäen von Zellen in Zellkulturflaschen (25 cm², 75 cm², 175 cm²) wurden die Zellen mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 0,01 in Erhaltungsmedium (5 ml, 15 ml, 30 ml) infiziert. Die MOI beschreibt die Anzahl infektiöser Virusartikel pro Zelle. Die Zellen wurden für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bevor weiteres Erhaltungsmedium (5 ml, 15 ml, 20 ml) zugegeben wurde. Wenige Tage nach der Infektion sind unter dem Mikroskop mehrkernige Riesenzellen sichtbar. Sobald 80 % der Zellen diesen MV-typischen zytopathischen Effekt (CPE) gezeigt haben, wurde der Zellkulturüberstand für 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

4.2.2. Virusinaktivierung

Das Impfvirus EdmZ wurde in inaktivierter Form für die Immunisierung von Mäusen verwendet. Zur Inaktivierung des MV wurde das Virus zunächst auf Vero Zellen vermehrt (Kap. 4.2.1). Der zentrifugierte virushaltige Überstand (Kap. 4.2.1) wurde mit β -Propiolacton (Endverdünnung= 1:2000) gemischt und der pH-Wert der Suspension mit NaHCO_3 auf 7,5 bis 8 eingestellt. Die Suspension wurde in einem Schüttler über Nacht bei 4 °C und anschließend für 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das inaktivierte Virus aufgereinigt (Kap. 4.2.3).

4.2.3. Virusaufreinigung

Die Virussuspension wurde mit Hilfe von Ultrazentrifugationen durch Sucroslösungen von unerwünschten Stoffen (z. B. Zelltrümmern) befreit. Für die erste Ultrazentrifugation wurden 5 ml einer 25 %igen Sucroslösung in einem Ultrazentrifugationsgefäß *Ultra ClearTM* mit 25 ml virushaltigem Medium überschichtet und für 90 min bei 70.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 – 3 ml NTE-Puffer aufgenommen und einer Ultrazentrifugation mit einem Sucrosegradienten unterzogen. Dafür wurden 5 ml einer 60 %igen Sucroslösung mit 10 ml einer 54 %igen Sucroslösung und 10 ml einer 25 %igen Sucroslösung überschichtet. Das gelöste Viruspellet wurde hinzugegeben und für 2 h bei 70.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die virushaltige Schicht zwischen der 25 %igen und 54 %igen Sucroslösung wurde entnommen und 1:3 in NTE-Puffer verdünnt. Die darin enthaltenen Viruspartikel wurden durch Ultrazentrifugation für 90 min bei 70.000 x g und 4 °C pelletiert, in PBS gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.4. Colorimetrischer Immunoassay

Mit einem Colorimetrischen Immunoassay wurden infektiöse Zentren einer Virusinfektion (Foci) in einem Zellrasen nachgewiesen. In dieser Arbeit lagen die zu untersuchenden Zellen in einer 48-Lochplatte vor (Kap. 4.2.5, 4.2.6). Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und mit 200 μl einer 2 %igen PFA-Lösung für 30 min auf Eis fixiert. Anschließend wurden sie gewaschen, mit 200 μl Methanol für 10 min bei -20 °C permeabilisiert und erneut mit PBS gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Ak-Bindungen, wurden die Zellen 30 min mit 200 μl Blockpuffer I inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μl eines MV-spezifischen Ak (*Monoclonal Antibody MAB 8906*, c= 2 $\mu\text{g/ml}$ in Blockpuffer I) für 30 min bei RT

inkubiert und zweimal mit Blockpuffer I gewaschen. Die Zellen wurden für 30 min mit 100 µl eines Peroxidase-gekoppelten Ak (*Goat Anti-Mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate*, c= 1 µg/ml in Blockpuffer I) inkubiert. Nach zwei Waschschrritten mit Blockpuffer I wurden 100 µl TMB *recomBlot* Substrat auf die Zellen pipettiert. Innerhalb von 5 min zeigt sich an den MV-spezifischen Foci ein Farbumschlag von farblos nach violett. Das Substrat wurde abgesaugt, die Zellen mit H₂O gewaschen und die Foci gezählt.

4.2.5. Bestimmung der Viruskonzentration

Die Anzahl der infektiösen Viruspartikel in einer Suspension wurde als *plaque forming units* pro ml (p.f.u./ml) angegeben. Zur Bestimmung der Viruskonzentration wurden Zellen (CHO-SLAM, Calu-3, Vero oder Vero/hSLAM) in 48-Lochplatten ausgesät (ca. 10⁵ Zellen/Vertiefung) und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die Virussuspension wurde in logarithmischen Stufen mit Erhaltungsmedium verdünnt und die Zellen mit je 100 µl Virusverdünnung für 1h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl CMC-*Overlay* überschichtet und für drei (CHO-SLAM), vier (Calu-3, Vero) oder fünf (Vero/hSLAM, Vero) Tage bei 37 °C inkubiert. Die Zentren virusinfizierter Zellen (Foci) wurden mit Hilfe eines Colorimetrischen Immunoassay (Kap. 4.2.4) markiert. Anhand dieser Markierung (Violettfärbung) wurde die Anzahl der Foci bestimmt, welche für die Bestimmung der Viruskonzentration notwendig ist:

$$\text{p.f.u./ml} = \text{Anzahl der Foci} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10$$

4.2.6. Neutralisationstest – *Focus of infection reduction neutralization test*

Die neutralisierende Kapazität von mAk und Seren gegenüber MV wurde mit einem *Focus of infection reduction neutralization test* (FRNT) bestimmt. Für diesen Test wurden Zellen in einer 48-Lochplatte ausgesät (10⁵ Zellen/Vertiefung) und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die mAk bzw. Seren wurden in einer geometrischen Verdünnungsreihe mit Erhaltungsmedium verdünnt. Anschließend wurden 75 µl der verdünnten mAk bzw. Seren mit 75 µl MV-Suspension (40 – 80 p.f.u./100 µl) gemischt. Während der Inkubation für 1 h bei 37 °C im Wasserbad können MV-spezifische Ak an das Virus binden. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und je 100 µl Ak/Serum-Virus-Suspension auf die Zellen gegeben. Die

Zellen wurden anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert. Je Vertiefung wurden 500 µl CMC-*Overlay* auf die Zellen gegeben und die Zellen erneut bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle wurden nichtinfizierte Zellen mitgeführt. Für die Viruskontrolle wurden Zellen mit Virus infiziert, welches zuvor weder mit Ak noch mit Serum inkubiert wurde. Drei (CHO-SLAM), vier (Calu-3) bzw. fünf (Vero) Tage nach der Infektion wurde ein Colorimetrischer Immunoassay (Kap. 4.2.4) zur Bestimmung der Anzahl der MV-spezifischen Foci durchgeführt. Jeder Testansatz wurde doppelt angesetzt, so dass für weitere Berechnungen der Mittelwert aus der Foci-Anzahl für jeden Testansatz verwendet wurde. Anhand dieser Foci-Anzahl wurde der 50 % Foci-Reduktionstiter bestimmt. Der 50 % Foci-Reduktionstiter ist als die reziproke Ak- bzw. Serumverdünnung definiert, die eine 50 %ige Reduktion der Foci-Zahl gegenüber der Viruskontrolle bewirkt. Die Berechnung des Titers erfolgte nach folgender Formel:

$$50 \% \text{ Foci-Reduktionstiter} = \frac{1}{2} \times (a \times b / c + d \times b / e)$$

a= reziproke Ak- bzw. Serumverdünnung für >50 % Foci-Reduktion

b= ½ Foci-Anzahl der Viruskontrolle

c= Foci-Anzahl für „a“

d= reziproke Ak- bzw. Serumverdünnung für <50 % Foci-Reduktion

e= Foci-Anzahl für „d“

Zum Ausgleich auftretender Schwankungen der Viruspartikelanzahl, wurde der 50 % Foci-Reduktionstiter nach folgender Formel mathematisch normiert:

$$\text{Normierter } 50 \% \text{ Foci-Reduktionstiter} = 50 \% \text{ Foci-Reduktionstiter} \times b / 15$$

Der normierte 50% Foci-Reduktionstiter gilt als Maß für die neutralisierende Kapazität der Ak bzw. Seren. Für die Angabe der neutralisierenden Kapazität wurde jeder Test wiederholt und der geometrische Mittelwert aus den Einzelversuchen für den normierten 50 % Foci-Reduktionstiter bestimmt. Die neutralisierende Kapazität wurde für mAk in ng/100 µl und für Seren als reziproke Serumverdünnung angegeben.

4.3. Herstellung monoklonaler Antikörper

Die Hybridomtechnik ist eine häufig verwendete Methode zur Gewinnung monoklonaler Antikörper (mAk). Dabei werden zunächst aus Myelomazellen und B-Lymphozyten immunisierter Mäuse Hybridomzellen hergestellt. Hybridomzellen besitzen die Eigenschaft der B-Lymphozyten Ak zu produzieren und sind, ebenso wie Myelomazellen, über einen sehr langen Zeitraum *in vitro* kultivierbar. MAK werden von einem Hybridomzellklon produziert, der auf einen einzelnen B-Lymphozyt zurückzuführen ist.

4.3.1. Immunisierung, Blutabnahme und Tötung der Versuchstiere

Zur Gewinnung von B-Lymphozyten, die MV-spezifische Ak produzieren, wurden zwei Balb/c Mäuse, nachfolgend mit Maus 1 und Maus 2 bezeichnet, mit inaktiviertem und aufgereinigtem EdmZ (Kap. 4.2.2, 4.2.3) immunisiert. Für die erste Immunisierung wurden 100 µl inaktiviertes EdmZ ($c= 0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBS) mit 100 µl komplettem Freund-Adjuvans gemischt und durch Ultraschallbehandlung homogenisiert. Das Adjuvans dient einer verzögerten Antigenfreisetzung und der Stimulation des Immunsystems. Die Applikation erfolgte intraperitoneal (i.p.). Zur Erhöhung der Anzahl antigenspezifischer Plasmazellen wurden die Versuchstiere erneut immunisiert (*Boost*-Immunisierung, Tab. 3). Dafür wurden 100 µl inaktiviertes EdmZ ($c= 0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBS) mit 100 µl unvollständigem Freund-Adjuvans gemischt und homogenisiert. Zur Erhöhung der Anzahl der Ak-produzierenden Hybridomzellen erfolgte in den letzten drei Tagen vor der Tötung der Tiere eine tägliche Immunisierung mit 100 µl inaktiviertem EdmZ ($c= 0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBS) ohne Adjuvans (Tab. 3) (139). Zur Bestimmung der neutralisierenden Kapazität des Serums (Kap. 4.2.6) wurde den Mäusen vor und nach der Immunisierung Blut entnommen (Tab. 3). Das Blut wurde für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert und das gewonnene Serum bei -20 °C gelagert.

Tab. 3: Immunisierung, Blutabnahme und Tötung der Versuchstiere.

	Tag (Maus 1)	Tag (Maus 2)
Blutabnahme <i>Präimmunserum</i>	- 1	- 1
1. Immunisierung i.p.	0	0
1. <i>Boost</i> -Immunisierung i.p.	21	21
Blutabnahme	31	31
2. <i>Boost</i> -Immunisierung i.p.	-	195
1.-3. Finale <i>Boost</i> -Immunisierung	38, 39, 40	213, 214, 215
Tötung, Blut-, Milzentnahme	41	216

4.3.2. Präparation von Myeloma-, Milz- und Thymuszellen

Präparation der Myelomazellen

Zur Präparation von Myelomazellen wurden 10^8 Myelomazellen P3x63Ag8.653 in Suspension für 8 min bei 380 x g und RT abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen zweimal mit RPMI 1640 gewaschen und wieder abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 30 ml RPMI 1640 aufgenommen.

Präparation der Milzzellen

Zur Gewinnung der B-Lymphozyten wurden die immunisierten Mäuse getötet und die Milz entnommen. Anschließend wurde die Milz unter sterilen Bedingungen aufgeschnitten und die Zellen mit 10 ml Waschpuffer IV ausgespült und aufgefangen. Das Gewebe wurde anschließend durch ein Zellsieb (Porengröße= 212 μ m) gedrückt und die gewonnenen Zellen mit der herausgespülten Zellsuspension vereint. Die Zellsuspension wurde für 8 min bei 380 x g und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 20 ml Waschpuffer IV resuspendiert, durch ein weiteres Sieb (Porengröße= 70 μ m) gegeben und erneut abzentrifugiert. Zur Lysis von Erythrozyten wurden anschließend 4 ml der Erythrozyten-Lyse-Lösung auf das Zellpellet pipettiert und die Suspension für 4 min geschüttelt. Die Suspension wurde mit Waschpuffer IV auf 40 ml aufgefüllt, erneut durch ein Sieb (Porengröße= 70 μ m) gegeben und für 8 min bei 380 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 ml RPMI 1640 resuspendiert. Mit Hilfe von Türks Lösung und einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt.

Präparation der Thymuszellen

Zellen der Thymusdrüse wurden zur Stimulation des Wachstums von Hybridomzellen verwendet. Pro Fusionsansatz wurden die Thymusdrüsen von drei nichtimmunisierten Balb/c-Mäuse verwendet. Die Organe wurden durch ein Sieb (Porengröße= 212 μ m) in 20 ml Waschpuffer IV gedrückt. Die Zellsuspension wurde für 8 min bei 380 x g und RT zentrifugiert und das Zellpellet in 20 ml R10F-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Türks Lösung und einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

4.3.3. Herstellung von Hybridomzellen

Zur Herstellung von Hybridomzellen wurden 10^8 Milzzellen mit 5×10^7 Myelomazellen P3x63Ag8.653 gemischt und die Zellsuspension für 8 min bei $380 \times g$ und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Bei kontinuierlicher Kreisbewegung des Reaktionsgefäßes wurde im Verlauf von 1 min 1 ml PEG 1500 zugegeben. Die Zellen wurden 2 min geschüttelt und anschließend wurde unter ständigem Schütteln im Verlauf von 4 min 4 ml RPMI 1640 zugegeben. Danach wurden 10 ml RPMI 1640 hinzugefügt und die Zellsuspension für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei $500 \times g$ und RT zentrifugiert und das Zellpellet mit R10F-Medium zu einer Dichte von 2×10^6 Milzzellen/ml resuspendiert. Die Suspension wurde mit 10^8 Thymuszellen gemischt und in 1 l Selektionsmedium, welches Azaserin und Hypoxanthin enthielt, aufgenommen. Anschließend wurden $200 \mu\text{l}$ der Zellsuspension je Vertiefung in eine 96-Lochplatte pipettiert und bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Die Selektion der Zellen beruht auf der Hemmung der Purinsynthese. Azaserin ist ein Strukturanalog des Glutamins und hemmt Reaktionen, bei denen der Amidstickstoff des Glutamins als Stickstoffdonor für die Neusynthese von Purinen wirkt. Zellen können mit Hilfe der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) zusätzlich Hypoxanthin zur Herstellung von Purinen nutzen. Die Myelomazellen P3x63Ag8.653 besitzen eine Mutation im Gen für HGPRT. Sie können daher keine Purine über diesen Stoffwechselweg synthetisieren (59) und sterben in Azaserin-haltigem Medium. Lymphozyten besitzen hingegen HGPRT. Da diese Zellen im Gegensatz zu Myelomazellen nur für kurze Zeit (ca. 5 – 8 Tage) *in vitro* kultivierbar sind, überleben lediglich fusionierte Zellen aus Lymphozyten und Myelomazellen die Kultivierung im Selektionsmedium. Am siebten und achten Tag nach der Zellfusion wurden aus jeder Vertiefung $100 \mu\text{l}$ Zellkulturüberstand abgenommen und durch frisches Selektionsmedium ersetzt. Je nach Wachstum der Hybridomzellen wurden die Zellkulturüberstände ab dem zehnten Tag nach der Zellfusion mit Hilfe eines S-FRNT auf MV-neutralisierende Ak untersucht (Kap. 4.3.5). Sofern neutralisierende Ak nachgewiesen werden konnten, wurden die Zellen subkloniert (Kap. 4.3.4) um mAk produzierende Einzelzellklone zu gewinnen. Der Zellkulturüberstand der Einzelzellklone wurden zehn bis zwanzig Tage später erneut mit einem S-FRNT (Kap. 4.3.5) untersucht. Positiv getestete Zellen wurden je nach Wachstum aus der 96-Lochplatte in Zellkulturplatten

bzw. -flaschen mit dem nächst größeren Volumen mit R10F-Medium umgesetzt und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

4.3.4. Subklonierung von Hybridomzellen

Zur Gewinnung monoklonaler Hybridomzellen wurden die Hybridomzellen vereinzelt. Die Anzahl der Hybridomzellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden anschließend in fünf Verdünnungsstufen in 12 ml Medium verdünnt (Tab. 4). Je 100 µl der verdünnten Zellsuspension wurden in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte pipettiert und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Nach sieben Tagen wurden zusätzlich 150 µl Medium zu den Einzelklonen gegeben. Ab dem zehnten Tag nach der Zellverdünnung wurde der Zellkulturüberstand erneut auf neutralisierende Ak (Kap. 4.3.5) getestet.

Tab. 4: Verdünnungsstufen zur Subklonierung von Hybridomzellen.

Verdünnungsstufe	Zellen je 100 µl
1	30
2	10
3	3
4	1
5	0,3

4.3.5. *Screening-Focus of infection reduction neutralization test*

Der Zellkulturüberstand der Hybridomzellen wurde mit Hilfe eines *Screening-Focus of infection reduction neutralization test* (S-FRNT) auf MV-neutralisierende Ak untersucht. Dafür wurden CHO-SLAM Zellen in einer 96-Lochplatte ausgesät (3×10^4 Zellen/Vertiefung) und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Am folgenden Tag wurden je 50 µl Hybridomzellkulturüberstand mit 50 µl EdmZ (40 – 80 p.f.u./100 µl) gemischt und für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Während der Inkubationszeit können vorhandene Ak an das Virus binden. Die Zellen wurden mit 50 µl dieser Suspension für 1h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl CMC-*Overlay* wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Platte wurde am nächsten Tag mikroskopisch ausgewertet. Das Ausbleiben eines MV-typischen CPE wies auf die Existenz MV-neutralisierender Ak im Hybridomzellkulturüberstand hin. Als Zellkontrolle wurden nichtinfizierte Zellen eingesetzt. Infizierte Zellen, dessen Virus vor dem Zellkontakt nicht mit Ak oder Serum inkubiert wurde, wurden als Viruskontrolle eingesetzt.

4.3.6. Durchflusszytometrische Analyse

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können physikalische und molekulare Eigenschaften von Zellen analysiert werden. Die Zellen werden in einem Probenstrahl hydrodynamisch fokussiert und mit einem Laser bestrahlt. Die gemessene Streuung und Emission des fluoreszierenden Lichtes ist abhängig von der Größe, Oberflächenstruktur und Granularität der Zelle. Fluoreszenzgekoppelte Ak können dabei für den Nachweis bestimmter Moleküle verwendet werden. In dieser Arbeit wurde in regelmäßigen Abständen eine Markierung der intrazellulären Ak in den Hybridomazellen durchgeführt, um die Stabilität der Hybridomzellklone hinsichtlich ihrer Ak-Produktion zu untersuchen. Dafür wurden 200 µl der Hybridomzellsuspension in eine 96-Lochplatte gegeben und für 5 min bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl einer 2 %igen Formaldehydlösung resuspendiert und für 20 min bei RT fixiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit PBS. Zur Permeabilisierung wurden die fixierten Zellen mit 150 µl Saponinpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde für 20 min mit 50 µl eines FITC-gekoppelten Ak (*Fluorescein-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG*, c= 2,3 µg/ml in Saponinpuffer), der an die intrazellulären Maus-Ak bindet, inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit Saponinpuffer gewaschen und in 200 µl Blockpuffer II aufgenommen. Zellen, die nicht mit dem FITC-markierten Ak inkubiert wurden, wurden als Referenz eingesetzt. Die Messung der fluoreszierenden Signale der Zellen erfolgte bei 530 nm im FACS Calibur™-Messgerät. Je Hybridomzellklon wurden 5.000 bis 10.000 Zellen analysiert, wobei tote Zellen und Zelltrümmer, die sich durch ihre geringe Größe und starke Granularität auszeichneten, nicht berücksichtigt wurden. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software *CellQuest Pro* ausgewertet und in einem Histogramm dargestellt, welches die Zellzahl in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität zeigt.

4.3.7. Aufreinigung von Antikörpern

Zur Gewinnung von mAk wurden die Hybridomzellen in Zellkulturflaschen mit R10F-Medium bei 37 °C im Brutschrank kultiviert, bis ca. 80 % der Zellen abgestorben waren. Die in das Medium sekretierten AK wurden durch eine Protein G-Affinitätschromatographie gereinigt und aufkonzentriert. Aus dem als Medienzusatz verwendeten FKS wurden zuvor auf gleiche Weise Serum-Ak entfernt, um eine

Kontamination der mAk zu vermeiden. Der Hybridomzellkulturüberstand wurde zunächst zweimal für 6 min bei 350 x g zentrifugiert, um Zellen und größere Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde anschließend durch ein Filtersystem (Porengröße= 0,4 µm) filtriert. Eine *HiTrapTM* Protein G-Säule (V= 1 ml) wurde in eine ÄKTA-Chromatographieanlage eingesetzt, mit H₂O gespült und mit PBS equilibriert. Anschließend wurden ca. 100 – 150 ml des Zellkulturüberstandes durch die Protein G-Säule gepumpt. Die Säule wurde anschließend mit PBS gewaschen und die mAk mit 3 – 6 ml des sauren Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die Geschwindigkeit, mit der die Flüssigkeiten durch die Protein G-Säule gepumpt wurden, betrug jeweils 1 ml/min. Die eluierten mAk wurden mit einem basischen Neutralisationspuffer neutralisiert (pH 7) und gegen PBS dialysiert. Vor Beginn der Dialyse wurden der Dialyseschlauch in 5 – 10 cm Abschnitte geschnitten, die 5 min in Dialysepuffer gekocht und mit H₂O gespült wurden. Anschließend wurden sie 5 min in 1 mM EDTA gekocht und erneut mit H₂O gespült. Der Dialyseschlauch-Abschnitt wurde an einem Ende mit einer Verschlussklammer verschlossen, mit dem neutralisierten Eluat gefüllt und am offenen Ende ebenfalls verschlossen. Die Dialyse erfolgte für mindestens 9 h bei 4 °C in 1 l PBS. Dabei wurde das PBS ständig gerührt und zweimal nach jeweils mindestens 3 h ausgetauscht. Anschließend wurden die mAk-Lösung durch einem Filter (Porengröße= 0,4 µm) gegeben und die Proteinkonzentration bestimmt (Kap. 4.4.1). Die mAk wurden bei -20 °C gelagert.

4.3.8. Isotypbestimmung

Zur Bestimmung des Isotyps eines mAk wurde das *IsoStripTM Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit* nach Anleitung des Herstellers verwendet.

4.4. Proteinbiochemische Methoden

4.4.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration der Proteine wurde mit Hilfe des *NanoDrop Spectrophotometer* bestimmt.

4.4.2. Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese

In einer Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine abhängig von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) verleiht dem Protein eine negative Ladung, so dass die elektrophoretische Auftrennung nach Proteingröße stattfindet. Für die Gelelektrophorese wurden 10 %ige oder 12 %ige Trenngel und ein Sammelgel hergestellt (Tab. 5). Das SDS-Gel wurde in eine Gelelektrophoresekammer eingebaut und SDS-Laufpuffer zugegeben. Proteine, deren Disulfidbrücken vor der Elektrophorese aufgespalten werden sollten, wurden im reduzierenden Probenpuffer *Roti®-Load1* aufgenommen und 5 min bei 99 °C inkubiert. Proben, deren Disulfidbrücken erhalten bleiben sollten, wurden im nichtreduzierenden Probenpuffer *Roti®-Load2* aufgenommen. Die Proben und ein Proteinmarker wurden in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert. Die Proteine wurden bei 15 mA getrennt und nach Bedarf mit *Roti®-Blue* nach Anleitung des Herstellers gefärbt. Die Größe der Proteine wurde anhand eines Vergleichs mit dem Proteinmarker bestimmt.

Tab. 5: Zusammensetzung eines SDS-Gels.

Komponente	Trenngel (10 %, 12 %)	Sammelgel
Acrylamid bis-Acrylamid (30 %)	10 ml, 12 ml	3,3 ml
H ₂ O	12 ml, 10 ml	13,7 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,5 ml
SDS (10 %)	300 µl	300 µl
TEMED	40 µl	40 µl
APS (10 %)	120 µl	120 µl

4.4.3. Western Blot Analyse

Mit Hilfe einer Western Blot Analyse können Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Dafür wurden die Proteine zunächst einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 4.4.2) und anschließend auf eine hydrophobe Polyvinylidendifluorid

(PVDF)-Membran übertragen. Die Membran wurde zuvor mit Methanol und H₂O gespült. Anschließend wurde die Membran zusammen mit dem Filterpapier und dem SDS-Gel für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte zwischen zwei Filterpapieren in der *Fast-Blot „semi-dry“* Apparatur bei 1,6 mA/cm² für 70 min. Die Proteine werden aufgrund hydrophober und elektrostatischer Wechselwirkungen an der Membran fixiert. Die Membran wurde getrocknet, in Methanol rehydriert und mit H₂O gespült. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen von Ak, wurde die Membran mit Blockpuffer III für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde mit Waschpuffer II gespült und entweder mit 10 ml eines Protein-spezifischen Ak, verdünnt in Blockpuffer V, in einer Schale oder mit 600 µl verdünntem Ak je Kanal eines *Mini-PROTEAN II multiscreen apparatus* für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit Waschpuffer II gewaschen und mit 10 ml eines Peroxidase-gekoppelten Ak (*Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG*, c= 0,2 µg/ml in Blockpuffer V) für 45 min bei RT in einer in einer Schale auf einem Schüttler inkubiert. Es erfolgte erneut ein Waschschrift mit Waschpuffer II. Das nachzuweisende Protein wurde mit Hilfe einer Detektionslösung durch Auflage und Entwicklung eines Röntgenfilmes visualisiert.

4.4.4. Immunpräzipitation

Bei einer Immunpräzipitation (IP) wird ein Protein mit einem spezifischen Ak aus einer Suspension präzipitiert und anschließend detektiert. In dieser Arbeit wurde diese Methode für die Bestätigung der Bindung von mAk an das H-Protein verwendet. Für jeden Ansatz wurden 15 µl aufgereinigtes EdmZ (c= 1,9 µg/µl) in 200 µl Lysispuffer aufgenommen und 1 h auf Eis geschüttelt. Anschließend wurden 10 µg Ak auf das Lysat pipettiert und die Suspension über Nacht bei 4° C geschüttelt. Um unspezifische Signale der mAk auszuschließen, wurden zusätzlich 10 µg Ak in Lysispuffer ohne Virus inkubiert. Am folgenden Tag wurden 20 µl Protein G Sepharose mit 500 µl Lysispuffer gewaschen, in 100 µl Lysispuffer resuspendiert und mit der mAk-Lysat-Suspension für 2 h bei 4 °C geschüttelt. Die Suspension wurde für 2 min bei 2500 x g zentrifugiert und das Pellet dreimal mit 500 µl Waschpuffer III gewaschen. Das Pellet wurde im reduzierenden Probenpuffer *Roti®-Load1* aufgenommen und 5 min bei 99 °C gekocht, um die Proteine von der Protein G

Sepharose zu lösen. Die Proben wurden anschließend in einer SDS-PAGE mit *Roti®-Blue*-Färbung analysiert (Kap. 4.4.2).

4.4.5. Peptide Microarray

Die Epitope von mAk können mit Hilfe eines *PepStar™ Peptide Microarrays* lokalisiert werden. Dieser *Peptide Microarray* bestand aus 116 Peptiden, die in ihrer Gesamtheit die AS-Sequenz der C-terminalen Rezeptor-Bindedomäne des Hämagglutinins (MV-H₁₄₅₋₆₁₇) des Impfvirus EdmZ präsentieren, und die in dreifacher Ausführung jeweils über einen Linker auf einem Objektträger immobilisiert waren. Die Peptide bestanden aus jeweils 15 AS, von denen sich 11 AS mit der Sequenz des darauf folgenden Peptides überlappten. Zusätzlich wurden Peptide synthetisiert und auf dem *Peptide Microarray* immobilisiert, die das NE und das HNE mit Sequenzvariationen im Vergleich zum EdmZ darstellen (Tab. 6). Drei HNE-Peptide wurden zusätzlich in C-C-zyklisierter Form auf dem *Peptide Microarray* immobilisiert. Nach Herstellerangaben besitzen die C-C-zyklisierten Peptide eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen (C).

Tab. 6: Zusätzliche Peptide auf dem *Peptide Microarray*.

Epitop	Peptid	Sequenzvariation im Vergleich zu EdmZ
NE	S ₂₄₁ KGSELSQLSMYRVF	R243→G243
NE	S ₂₄₁ KGSELPQPSMYRVF	R243→G243, S247→P249, L247→P249
NE	S ₂₄₁ KGSELSQLSMHRVF	R243→G243, Y252→H252
NE	GGSGGSGGS ₂₄₄ ELSQLS	Linker GGSGGSGG
HNE	C ₃₈₁ FQQACKGKIQALCENPEWA	MV-H ₃₈₁₋₄₀₀ , original
HNE	S ₃₈₁ FQQACKGKIQALCENPEWA	C381→S381, zusätzlich C-C-zyklisiert
HNE	C ₃₈₁ FQQASKGKIQIALCENPEWA	C386→S386, zusätzlich C-C-zyklisiert
HNE	C ₃₈₁ FQQACKGKIQALSENPEWA	C394→S394, zusätzlich C-C-zyklisiert
HNE	S ₃₈₁ FQQASKGKIQALSENPEWA	C381→S381, C386→S386, C394→S394

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für Ak wurde der *Peptide Microarray* für 1 h bei RT in *SuperBlock T20 TBS Blocking Puffer* inkubiert. Anschließend wurde nach Anleitung des Herstellers eine Inkubationskammer (*microarray-chip-sandwich*) aufgebaut und der *Peptide Microarray* mit 300 µl mAk (c= 10 µg/ml in *SuperBlock T20 TBS Blocking Puffer*) für 2 h bei RT inkubiert. Der *Peptide Microarray* wurde fünfmal mit TBS gewaschen und mit 3 ml Cy5-gekoppeltem Fab-Fragment (*CyTM5-conjugated AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG*, c= 5,3 µg/ml in *SuperBlock T20 TBS Blocking Puffer*) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der *Peptide Microarray* jeweils fünfmal mit TBS und H₂O gewaschen und für 3

min bei 900 x g zentrifugiert. Die Messung der fluoreszierenden Signale erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm mit GenePix 4000B. Mit Hilfe der Software *GenePix Pro 6.1* wurde der Median der Fluoreszenzintensität der einzelnen Pixel (10 µm) für das Peptid- abzüglich des Signalhintergrundes- berechnet. Anschließend wurde der Mittelwert der Mediane für die drei Peptide bestimmt. Sofern ein Einzelwert mehr als 1,5 x vom Mittelwert abwich, wurde er nicht berücksichtigt.

4.4.6. Immunfluoreszenztest

Die Bindung eines Ak an ein von Zellen exprimiertes Protein wurde mit Hilfe eines Immunfluoreszenztests (IFT) nachgewiesen. Für diesen Test wurden HEK-293G Zellen auf Deckgläschen in einer 24-Lochplatte ausgesät und am folgenden Tag mit einem Expressionsplasmid transfiziert (Kap. 4.1.3). Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 150 µl einer 3,7 %igen PFA-Lösung in PBS 10 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung 10 min mit 150 µl 0,1 % TritonX-100 in PBS behandelt. Die Zellen wurden mit Waschpuffer II gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 1 h bei RT mit 150 µl Blockpuffer IV inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Waschpuffer II wurden die Zellen mit 150 µl mAk (c= 0,5 µg/µl in Blockpuffer IV) für 1 h bei RT inkubiert und erneut gewaschen. Die Zellen wurden mit 150 µl eines Alexa Fluor® 488-gekoppelten Ak (*Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG*, c= 1 µg/ml in Blockpuffer IV) für 1 h inkubiert und erneut gewaschen. Die DNA der Zellkerne wurde durch eine Inkubation für 5 min mit 150 µl DAPI (c= 0,25 µg/µl in Blockpuffer IV) gefärbt. Die Deckgläschen wurden abschließend dreimal jeweils mit Waschpuffer II und PBS gewaschen und mit Mowiol auf dem Objektträger eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser Raster Mikroskop (cLSM) bei einer Laserwellenlänge von 488 nm und mit der Software *LSM Image Browser 4. 2.*

4.4.7. Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Die Methode des *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ermöglicht den Nachweis einer Bindung zwischen Ak und Antigen durch eine enzymatische Farbreaktion. In dieser Arbeit wurde ein indirekter ELISA zum Nachweis der Bindung eines mAk an das MV angewendet. Dafür wurden 100 µl des mAk in verschiedenen Verdünnungen (c= 0,02 – 2 µg/ml in *Casein Diluent* Puffer) für 1 h auf einer

Mikrotiterplatte mit Edm-Lysat-Beschichtung (MV-Mikrotiterplatte) bei RT inkubiert. Die MV-Mikrotiterplatte wurde viermal mit Waschpuffer I gewaschen, für 30 min mit 100 µl eines Peroxidase-gekoppelten Ak (*Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG*, $c=0,14\ \mu\text{g/ml}$ in *Casein Diluent Puffer*) bei RT inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Danach wurden 100 µl TMB-Substrat-Lösung zugegeben. Die enzymatische Reaktion wurde mit 50 µl 1 M H_2SO_4 gestoppt. Die Optische Dichte (OD) wurde bei 450 nm sowie bei der Referenzwellenlänge von 620 nm mit dem *FLUOstar Omega Reader* gemessen und die Differenz ΔOD berechnet:

$$\Delta\text{OD} = \text{OD}_{450\text{nm}} - \text{OD}_{620\text{nm}}$$

Der Versuch erfolgte in einer Doppelbestimmung, aus denen der Mittelwert berechnet wurde. Dieser Versuch wurde parallel auf einer Mikrotiterplatte ohne Antigen durchgeführt, um eventuell vorhandene unspezifische Interaktionen zwischen dem mAk und der Mikrotiterplatte nachzuweisen.

4.4.7.1. Aviditäts-ELISA

Die Gesamtbindungsstärke eines Ak an ein Antigen wird als Avidität bezeichnet. Mit Hilfe eines Aviditäts-ELISA (100) wurde die Avidität eines mAk an das MV Edm bestimmt. Für diesen Test wurde eine Verdünnung des mAk gewählt, bei der im Standard ELISA (Kap. 4.4.7) alle spezifischen Epitope auf der MV-Mikrotiterplatte abgesättigt waren und gleichzeitig keine unspezifischen Bindungen auf einer Mikrotiterplatte ohne Antigen auftraten. Auf einer MV-Mikrotiterplatte wurden je 100 µl des in Casein Diluent Puffer verdünnten mAk für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte viermal mit Waschpuffer I gewaschen und mit je 100 µl Ammoniumthiocyanat (NH_4SCN)-Lösung in unterschiedlichen Molaritäten (0 M; 0,25 M; 0,5 M; 0,75 M; 1 M; 1,5 M; 2 M; 2,5 M in Phosphatpuffer) für 15 min bei RT inkubiert. Das chaotrophe Reagenz Thiocyanat dissoziiert Ak-Antigen-Komplexe in Abhängigkeit von ihrer Bindungsstärke (21). Nach einem Waschschrift wurde die Ak-Antigen-Wechselwirkung, wie für den Standard ELISA beschrieben (Kap. 4.4.7) mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Ak und einer TMB-Substrat-Lösung, über eine enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen. Zur Berechnung der prozentualen optische Dichte (ODp) wurde jeweils die gemessene ΔOD mit

(OD_{NH_4SCN}) und ohne (OD_0) NH_4SCN -Behandlung ermittelt und in folgende Formel eingesetzt:

$$ODp = OD_{NH_4SCN} / OD_0 \times 100 \%$$

Nach Darstellung der ODp in Abhängigkeit der Molarität von NH_4SCN ($M_{(NH_4SCN)}$) in einem Diagramm wurde für die Ermittlung des Aviditätsindex (AI) eine Regressionsanalyse im linearen Bereich durchgeführt. Der AI entspricht der $M_{(NH_4SCN)}$, bei der OD_0 um 50 % reduziert wurde. Je stärker die Bindung zwischen Antigen und Ak ist, umso höher ist der Aviditätsindex.

4.4.8. Massenspektrometrische Analyse

Die Massenspektrometrie ermöglicht die Identifikation, Quantifizierung und Strukturaufklärung organischer und anorganischer Stoffe. Dabei werden Substanzen in der Ionenquelle (hier: Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisation, MALDI) ionisiert und im Massenanalysator (hier: Flugzeitmassenanalysator TOF) entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt. Zur Untersuchung der Individualität des Proteinaufbaus der erzeugten mAk wurden die mAk tryptisch verdaut und ihre Fragmente mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer analysiert. Dafür wurden 2 μ g mAk in 25 μ l Trypsinpuffer aufgenommen und zur Reduktion der Disulfidbrücken für 10 min mit 1,5 μ l 1,4-Dithiothreit bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in einem Eisbad abgekühlt und zur Blockierung freier Thiolgruppen mit 3 μ l Iodacetamid für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 15 μ l Trypsinlösung folgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Die tryptisch verdauten Ak wurden mit *ZipTip*®-Spitzen (C18 Phase) entsprechend dem Herstellerprotokoll entsalzt und aufkonzentriert. Je 1 μ l der Peptidlösung bzw. der Kalibrierungspeptide *Peptide Calibration Standard II* wurde mit 1 μ l HCCA-Matrix vermischt und auf das *MTP 384 Stahltarget T F* aufgetragen und in einem MALDI-TOF AutoflexTM Massenspektrometer mit Hilfe der Software *flexControl 3.1* analysiert. Dabei wurden Spektren erstellt, die die relative Intensität der Signale in Abhängigkeit des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) der Fragmente darstellen. Ein Vergleich der Signalintensitäten zwischen den Spektren der einzelnen mAk mit Hilfe der Software *flexAnalysis 2.4* gibt Hinweise auf die Individualität des Aufbaus der jeweiligen mAk.

4.5. Molekularbiologische Methoden

4.5.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des *NanoDrop Spectrophotometer* bestimmt.

4.5.2. Isolierung viraler RNA und cDNA-Synthese

Virale RNA wurde aus virushaltigem Zellmedium unter Verwendung des *QIAmp®Viral RNA Mini Kit* isoliert und anschließend durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese wurde die virale RNA mit einem Primer und Desoxyribonukleotiden (dNTP) für 5 min bei 65 – 70 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzuschließen und somit eine optimale Bindung der Primer an die RNA zu ermöglichen (Tab. 7).

Tab. 7: 1. Reaktionsansatz zur Herstellung von cDNA.

Komponente	Volumen (µl)
Virale RNA	2,5
Primer (25 µM)	0,7
dNTP	0,5
PCR-H ₂ O	ad 5

Nach einer Abkühlung auf Eis wurde der 2. Reaktionsansatz (Tab. 8) hinzugefügt und für die cDNA-Synthese für 1 h bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 15 min bei 70 °C inaktiviert.

Tab. 8: 2. Reaktionsansatz zur Herstellung von cDNA.

Komponente	Volumen (µl)
5x <i>First Strand Buffer</i>	2
DTT	0,5
RNasin® RNase	0,5
SuperScript® III <i>Reverse Transcriptase</i>	0,5

4.5.3. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Die Matrizen-DNA wird zunächst bei hohen Temperaturen denaturiert, um die als Doppelstrang vorliegende DNA in Einzelstränge aufzutrennen. In einem *Annealing*-Schritt bei einer Temperatur (T_a), die etwas unterhalb der Schmelztemperatur der Primer liegen sollte, lagern sich die Primer komplementär an die DNA-Einzelstränge

an. In der Elongationsphase verlängert die hitzestabile DNA-Polymerase die Primer mit Hilfe von dNTPs komplementär zur Matrizen-DNA. Dieser Ablauf wird mehrfach in einem *Thermocycler* wiederholt und so die DNA vervielfältigt.

Tab. 9: Reaktionsansatz für eine PCR.

Komponente	Volumen (µl)
DNA (10 – 100 ng)	2,5
5x Phusion® HF <i>Reaction Buffer</i>	5
dNTP	0,5
Primer <i>sense</i> (25 µM)	0,5
Primer <i>antisense</i> (25 µM)	0,5
Phusion® <i>Hot Start</i> DNA Polymerase	0,25
PCR-H ₂ O	ad 25

4.5.4. Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA kann zur weiteren Verwendung aus dem Gel extrahiert werden. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde 1 % Agarose in TAE-Puffer unter ständigem Rühren aufgeköcht und der fluoreszierende Nukleinsäurefarbstoff *GelRedTM* zugegeben. Die Lösung wurde anschließend in einen Gelschlitten gegossen. Nach Abkühlung des Geles und Einsetzen in eine Agarosegelelektrophorese-Kammer wurde der Laufpuffer 0,5 x TAE zugegeben und die PCR Probe mit 1/5 DNA-Probenpuffer in die Geltaschen pipettiert. Die Trennung der DNA erfolgte in einem elektrischen Feld bei 80 V entsprechend ihrer Größe. Diese Größe konnte mit Hilfe eines zusätzlich aufgetragenen DNA-Markers unter UV-Licht in einem Fotodokumentationssystem bestimmt und dokumentiert werden.

4.5.5. Nukleinsäuresequenzierung

Die Ermittlung der Nukleinsäuresequenz von DNA erfolgte nach der Sanger-Methode. Bei dieser Methode sind im Reaktionsansatz zusätzlich zu dNTP geringe Mengen 2', 3'-Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) enthalten, die mit einem nukleotidspezifischen Farbstoff markiert sind. Aufgrund einer fehlenden 3'-OH-Gruppe am Ribosering der ddNTPs bricht nach ihrem Einbau die Replikation der DNA an dieser Stelle ab. Im Reaktionsgemisch entstehen so unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die an ihren Enden entsprechend ihrem eingebauten ddNTP farblich markiert sind. Die DNA-Fragmente werden der Größe nach aufgetrennt und so die Sequenz bestimmt. Die zu sequenzierende DNA wurde mit Hilfe des *ABI*

PRISM Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Tab. 10) und einem spezifischen Sequenzierungsprimer (Tab. 11) nach Protokoll (Tab. 12) in einem *Thermocycler* amplifiziert.

Tab. 10: Reaktionsansatz für eine Sequenzierungs-PCR.

Komponente	Volumen (µl)
DNA (10-100 ng)	x
5 x Puffer	1,5
Primer (10 µM)	0,5
<i>Big Dye</i>	1
PCR-H ₂ O	ad 10

Tab. 11: Sequenzierungsprimer und ihre *Annealing*-Temperatur (Ta).

Primer	Ta (°C)
MaH5s	62
MaH9s	68
MaH12as	50
MaH13s	56
MaH14s	50
MaH15as	62
3291s	50
3292as	50
3374s	50
3375as	50

Tab. 12: *Thermocycler*-Protokoll für eine Sequenzierungs-PCR.

Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur (°C)
1	2,5 min	90
25	10 s	96
	5 s	Ta
	4 min	60

Die Analyse wurde vom Sequenzierlabor des Robert Koch-Institutes mit einem *3500xl Dx Genetic Analyzer* durchgeführt. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit der Software *Geneious 5.4* ausgewertet. Für die Umwandlung der Nukleinsäuresequenz in eine Aminosäuresequenz sowie für einen Sequenzvergleich wurde die Software *MacVector 12.0.6* verwendet.

4.5.6. Amplifikation des H-Gens zur Sequenzanalyse

Zur Sequenzierung des H-Gens wurde zunächst cDNA mit Hilfe des Primers 3376s synthetisiert (Kap. 4.5.2) und das H-Gen anschließend mit Hilfe einer *Nested-PCR* amplifiziert. Die erste PCR wurde mit den Primern 3376s und 3377as angesetzt (Tab. 9) und die Reaktion nach folgendem Protokoll im *Thermocycler* durchgeführt (Tab. 13):

Tab. 13: *Thermocycler*-Protokoll für eine PCR zur Amplifikation des H-Gens.

Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur (°C)
1	30 s	98
25	10 s	98
	30 s	60
	2 min	72
1	5 min	72

Das Amplifikat wurde anschließend mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt und als Matrizen-DNA für die zweite PCR mit den Primern 3374s und 3375as eingesetzt (Tab. 9). Die zweite PCR fand unter den gleichen Bedingungen wie für die erste PCR statt (Tab. 13). Die Amplifikate wurden erneut aufgereinigt und anschließend für die Sequenzierung eingesetzt (Kap. 4.5.5).

4.5.7. Konstruktion eines Expressionsplasmids

Zur Insertion des H-Gens in den Vektor pcDNA3.1(+) wurde zunächst mit Hilfe des Primers MaH1 cDNA hergestellt (Kap. 4.5.2). Anschließend wurde das H-Gen in der cDNA mit Primern amplifiziert, die zusätzlich zu der zum H-Gen komplementären Nukleinsäuresequenz am 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle für ein Enzym besaßen (Klonierungsprimer, Tab. 17). Die Vorwärtsprimer besaßen eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym EcoR1 und die Rückwärtsprimer für das Enzym Not1. Der Reaktionsansatz wurde wie bereits beschrieben hergestellt (Tab. 9) und die PCR im *Thermocycler* durchgeführt (Tab. 14).

Tab. 14: *Thermocycler*-Protokoll für eine PCR mit Klonierungsprimern.

Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur (°C)
1	30 s	98
35	10 s	98
	30 s	55
	2 min	72
1	5 min	72

Die PCR-Amplifikate wurden mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt. Diese Amplifikate (*Insert*) und der Vektor wurden jeweils mit den Enzymen Not1 und EcoR1 für 1 h bei 37 °C verdaut (Tab. 15). Die Restriktionsenzyme schneiden die komplementären DNA-Stränge versetzt, so dass einzelsträngige Überhänge, sogenannte kohäsive Enden, entstehen.

Tab. 15: Reaktionsansatz für einen Enzymverdau von Vektor und PCR-Amplifikaten.

Komponente	Volumen (µl)
PCR-Amplifikate (<i>Insert</i>), Vektor	(je 0,5 – 1 µg)
EcoR1 Puffer	2,5
EcoR1	1
Not1	1
H ₂ O	ad 25

Die DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt (Kap. 4.5.4) und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für die Ligation wurde der Vektor mit der 5 – 10 fachen Menge an *Insert*-DNA, T4 DNA Ligase Puffer und T4 DNA Ligase für 20 min bei RT inkubiert (Tab. 16). Die DNA Ligase verknüpft die DNA-Stränge, indem sie eine Esterbindung zwischen der Desoxyribose und einem Phosphatrest ausbildet.

Tab. 16: Reaktionsansatz für eine Ligation.

Komponente	Volumen (µl)
Insert und Vektor	Insert : Vektor= 5 – 10 : 1
T4 DNA Ligase	1
T4 DNA Ligase Puffer	2
H ₂ O	ad 20 µl

Zur Vermehrung wurden chemisch-kompetente DH5α Bakterien mit dem erzeugten Plasmid transformiert. Für die Transformation wurden 2,5 µl der Plasmid-DNA (100 – 200 ng) mit 50 µl Bakteriensuspension gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Ampicillin-haltigen (c= 70 ng/ml) LB-Agar-Platten ausgestrichen und für 12 – 15 h bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Einzelne Bakterienklone wurden in jeweils 5 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium aufgenommen und erneut bei 37 °C kultiviert. Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA, wurden die Bakterien in 150 – 300 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde je nach Volumen der Bakteriensuspension mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (2 ml), *NucleoBond®Xtra Midi Kit* (150 ml) oder *NucleoBond®Xtra Maxi Kit* (300 ml) entsprechend dem Herstellerprotokoll präpariert. Mit Hilfe einer Sequenzierungs-PCR (Kap. 4.5.5) mit den Primern MaH5s, MaH9s, MaH13s und MaH15as wurde überprüft, ob das Insert vollständig im Plasmid enthalten ist.

Tab. 17: Hergestellte Plasmide mit dem H-Gen als *Insert*.

Plasmid mit H-Gen	MV-Isolat [Genotyp]	Klonierungsprimer
pcDNA_MV-H_Berlin.DEU/47.00	Berlin.DEU/47.00 [D6]	3304s, 3305as
pcDNA_MV-H_Duisburg.DEU/10.09	Duisburg.DEU/10.09 [D4]	3302s, 3303as
pcDNA_MV-H_Berlin.DEU/10.10	Berlin.DEU/10.10 [D8]	3304s, 3271as
pcDNA_MV-H_Essen.DEU/12.10	Essen.DEU/12.10 [D8]	3270s, Ma105as

4.5.7.1. Mutagenese des H-Gens

Mit Hilfe einer PCR mit zwei zueinander komplementären Primern wurden in einem bereits im Plasmid vorliegenden H-Gen Mutationen eingefügt. Die Primer enthielten in der Mitte ihrer Nukleotidsequenz die gewünschte veränderte Nukleinsäure (Mutagenese-Primer, Tab. 20). Für die PCR wurde ein Reaktionsansatz (Tab. 18) hergestellt und nach Protokoll im *Thermocycler* inkubiert (Tab. 19).

Tab. 18: Reaktionsansatz einer PCR zur Mutagenese.

Komponente	Volumen (µl)
PCR-H ₂ O	19,5
Plasmid-DNA (50 – 100 ng)	1
10 x Pfu Ultra™ HF <i>Reaction Buffer</i>	2,5
dNTP	0,5
Pfu Ultra HF DNA Polymerase	0,5
Primer <i>sense</i> (10 µM)	0,5
Primer <i>antisense</i> (10 µM)	0,5

Tab. 19: *Thermocycler*-Protokoll einer PCR mit Mutagenese-Primern.

Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur (°C)
1	30 s	95
12	30 s	95
	60 s	55
	8 min	68

Im Gegensatz zu den PCR-Amplifikaten liegt die Ausgangs-Plasmid-DNA, welche aus den Bakterien DH5 α isoliert wurde, methyliert vor und kann dadurch von der Endonuklease Dpn1 geschnitten werden. Der PCR-Ansatz wurde mit 1 µl Dpn1 für 1 h bei 37 °C verdaut, um die unmutierte Ausgangs-Plasmid-DNA zu entfernen. Anschließend wurden die PCR-Amplifikate aufgereinigt und in chemisch kompetente DH5 α Bakterien transformiert (Kap. 4.5.7), in denen die PCR-Amplifikate zirkularisiert und vermehrt werden. Einzelne Bakterienklone wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert (Kap. 4.5.7). Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde je nach Volumen der Bakteriensuspension das *QIAprep Spin Miniprep Kit*, *NucleoBond®Xtra Midi Kit* oder *NucleoBond®Xtra Maxi Kit* angewendet. Zum Nachweis der gewünschten Mutation wurde die mutierte Plasmid-DNA mit den Primern MaH9s (Mutation MV-H₂₄₇,

MV-H₂₄₉), MaH12as (Mutation MV-H₃₈₇) bzw. MaH14s (Mutation MV-H₃₁₃, MV-H₃₁₄) sequenziert (Kap. 4.5.5).

Tab. 20: Hergestellte Plasmide mit Mutationen im H-Gen.

Plasmid	Ausgangsplasmid	Primer	Mutation
pcDNA_MV-H_EdmZ-P247	pcDNA_MV-H_EdmZ	3328s, 3329as	S247→P247
pcDNA_MV-H_EdmZ-P249 (Kontrolle für Berlin.DEU/47.00 [D6])	pcDNA_MV-H_EdmZ	3342s, 3343as	L249→P247
pcDNA_MV-H_EdmZ_P249 (Kontrolle für Duisburg.DEU/10.09 [D4])	pcDNA_MV-H_EdmZ	3344s, 3345as	L249→P249
pcDNA_MV-H_EdmZ_P247_P249	pcDNA_MV-H_EdmZ	3346s, 3347as	S247→P247 L249→P249
pcDNA_MV-H_EdmZ_L313	pcDNA_MV-H_EdmZ	3368s, 3369as	S313→L
pcDNA_MV-H_EdmZ_R314	pcDNA_MV-H_EdmZ	3370s, 3371as	G314→R
pcDNA_MV-H_EdmZ_R387	pcDNA_MV-H_EdmZ	3336s, 3337as	K387→R387
pcDNA_MV-H_ Duisburg.DEU/10.09_L249	pcDNA_MV-H_ Duisburg.DEU/10.09	3354s, 3355as	P249→L249
pcDNA_MV-H_Berlin.DEU/47.00_S247	pcDNA_MV-H_ Berlin.DEU/47.00	3318s, 3319as	P247→S247
pcDNA_MV-H_Berlin.DEU/47.00_L249	pcDNA_MV-H_ Berlin.DEU/47.00	3320s, 3321as	P249→L249
pcDNA_MV-H_ Berlin.DEU/47.00_S247_L249	pcDNA_MV-H_ Berlin.DEU/47.00	3322s, 3323as	P247→S247 P249→L249
pcDNA_MV-H_Berlin.DEU/10.10_R387	pcDNA_MV-H_ Berlin.DEU/10.10	3334s, 3335as	K387→R387
pcDNA_MV-H_Essen.DEU/12.10_K387	pcDNA_MV-H_ Essen.DEU/12.10	3338s, 3339as	R387→K398

5. Ergebnisse

5.1. Sequenzanalyse des H-Proteins

Eine Masernimpfung bzw. MV-Erstinfektion induziert MV-neutralisierende Ak, die eine wesentliche Rolle für eine lang anhaltende Immunität spielen. Der Hauptanteil der neutralisierenden Ak ist gegen Epitope des H-Proteins gerichtet. Zur Charakterisierung neutralisierender Epitope wurden zunächst die Sequenzdaten des H-Proteins unterschiedlicher MV-Isolate analysiert (Tab. 21). Neben den Impfviren Edmonston-Zagreb (EdmZ) und Edmonston-Schwarz (EdmS) wurden Wildtyp-Viren ausgewählt, die im Zeitraum von 2000 bis 2010 in Deutschland zirkulierten. Zusätzlich wurden die Wildtyp-Isolate MVi/Maryland.USA/0.54 und MVi/Sofia.BGR/19.05 charakterisiert. Die Wildtyp-Viren wurden, mit Ausnahme von MVi/Maryland.USA/0.54, im Nationalen Referenzzentrum Masern, Mumps, Röteln (NRZ MMR) am Robert Koch-Institut aus Patientenmaterial isoliert und der WHO Nomenklatur entsprechend genotypisiert (155).

Tab. 21: Sequenzdaten des H-Gens ausgewählter MV-Isolate.

Die virale RNA wurde aus dem Viruspartikel isoliert und zur Herstellung von cDNA verwendet (Kap. 4.5.2). Das H-Gen wurde anschließend über eine *Nested*-PCR amplifiziert (Kap. 4.5.6) und mit den Primern MaH15as, 3291s, 3292as, 3374s und 3375as sequenziert (Kap. 4.5.5).

* Sequenzdaten wurden in dieser Arbeit gewonnen.

** Am NRZ MMR ermittelte Sequenzdaten stimmen mit Daten in der GenBank überein.

MV-Isolat	Genotyp	H-Gen GenBank Acc.-No
EdmZ (Impfvirus)	A	AF266290**
EdmS (Impfvirus)	A	AF266291**
MVi/Maryland.USA/0.54	A	JX436452*
MVi/Tuebingen.DEU/24.00	C2	AF480468
MVi/Berlin.DEU/11.10	B3	JQ417683
MVi/Duisburg.DEU/10.09	D4	JQ417682
MVi/Berlin.DEU/04.08	D5	JQ927007
MVi/Berlin.DEU/47.00	D6	AF480474
MVi/Duesseldorf.DEU/10.00	D7	AF480471
MVi/Essen.DEU/12.10	D8	JQ417684
MVi/Berlin.DEU/10.10	D8	JQ417681
MVi/Sofia.BGR/19.05	H1	FJ808736
MVi/Berlin.DEU/44.01	H1	FJ808737

Zur besseren Übersichtlichkeit entfällt im Folgenden das Präfix „MVi/“ im Namen der Virusisolate.

Das Wildtyp-Virus Maryland.USA/0.54 wurde nach wenigen Passagen des erstmals aus Patientenmaterial auf Zellen angezüchteten MV Edm (32) gewonnen. Das MV Edm ist das Ausgangsvirus vieler zum Zweck der Impfung attenuierten Viren wie EdmZ und EdmS (Abb. 11). In dieser Arbeit wurden mAk gegen das Impfvirus EdmZ hergestellt und für die Charakterisierung neutralisierender Epitope eingesetzt. Ein Vergleich der Sequenzen des H-Proteins (617 AS) zeigt, dass sich die Sequenzen der Impfviren EdmS und EdmZ um je sechs AS von Maryland.USA/0.54 unterscheiden. Das H-Protein der Impfviren EdmS und EdmZ unterscheidet sich um vier AS voneinander. Das H-Protein der aktuell zirkulierenden Wildtyp-Viren unterscheidet sich um 14 – 30 AS (2,3 – 4,9 %) vom Impfvirus EdmZ (Abb. 13).

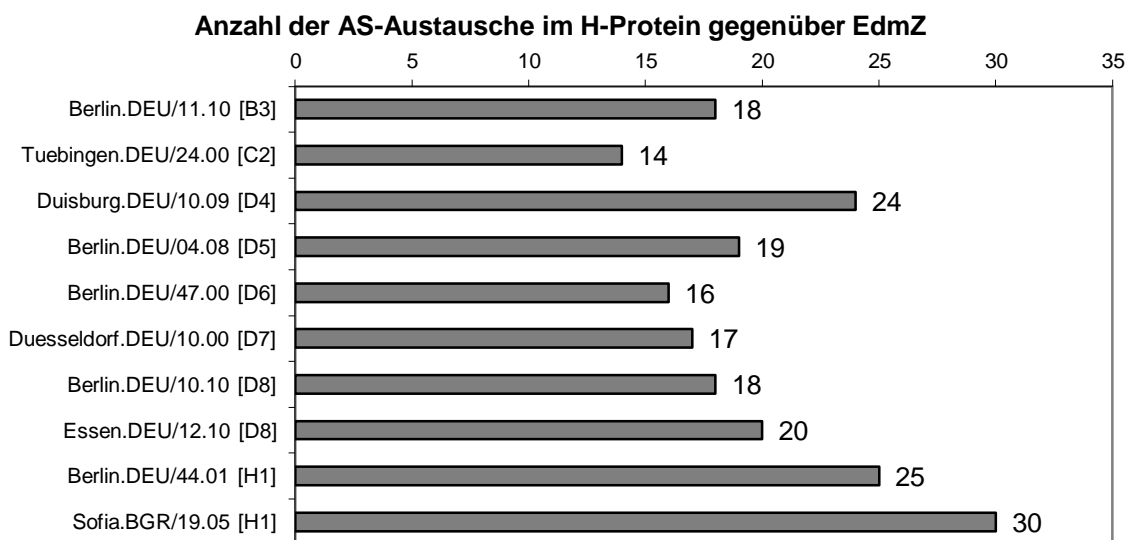


Abb. 13: Anzahl der AS-Austausche im H-Protein von aktuellen Wildtyp-Viren gegenüber dem Impfvirus EdmZ.

Ein Sequenzvergleich ermöglichte die Zuordnung der AS-Abweichungen zu den einzelnen Domänen des H-Proteins (Abb. 14). In der zytoplasmatischen Domäne (I), dem Transmembranbereich (II) und der Stiel-Region (III) traten weniger AS-Austausche auf, als in der C-terminalen Rezeptor-Bindedomäne (IV). Der Bereich des β 5-Faltblattes (V), welcher viele mit den Zellrezeptoren CD46, SLAM und Nectin-4 interagierende AS enthält, war hingegen konserviert.

Ergebnisse

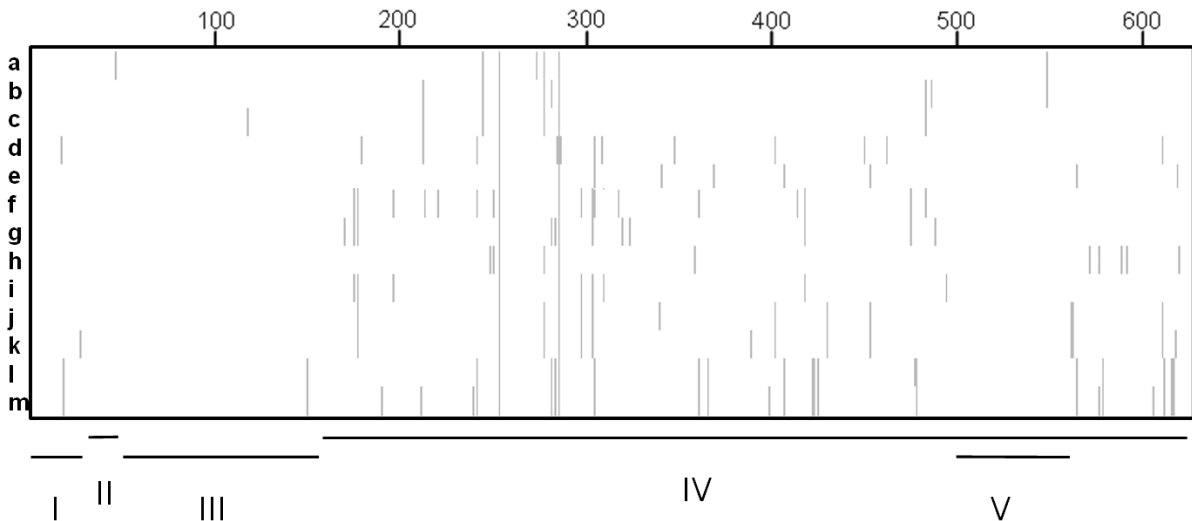


Abb. 14: Vergleich der AS-Sequenzen des H-Proteins der untersuchten MV-Isolate.

Sequenzunterschiede sind grau markiert.

Eingesetzte MV:	a) Maryland.USA/0.54 [A],	b) EdmZ [A],
c) EdmS [A],	d) Tuebingen.DEU/24.00 [C2],	e) Berlin.DEU/11.10 [B3],
f) Duisburg.DEU/10.09 [D4],	g) Berlin.DEU/04.08 [D5],	h) Berlin.DEU/47.00 [D6],
i) Duesseldorf.DEU/10.00 [D7],	j) Berlin.DEU/10.10 [D8],	k) Essen.DEU/12.10 [D8],
l) Berlin.DEU/44.01 [H1],	m) Sofia.BGR/19.05 [H1]	
Proteindomänen:	I) zytoplasmatischer Bereich	II) Transmembranbereich
III) Stiel-Region	IV) C-terminale Kopfdomäne	V) β5-Faltblatt

Das Impfvirus EdmZ besitzt potentielle Glykosylierungsstellen an den Positionen N168, N187, N200, N215 und N238. Einige Wildtyp-Viren zeigen AS-Austausche, die entweder zum Verlust einer Glykosylierungsstelle oder zum Erwerb einer zusätzlichen Glykosylierungsstelle führen (Tab. 22). So führte der Austausch von S240 zu N240 in den Isolaten Berlin.DEU/11.10, Duisburg.DEU/10.09, Berlin.DEU/44.01 und Sofia.BGR/19.05 zum Verlust der potentiellen Glykosylierungsstelle an Position 238. Das Isolat Sofia.BGR/19.05 zeigte an dieser Stelle zusätzlich den Austausch von N238 zu S238. Zudem wird dieses Isolat durch den AS-Austausch von S189 zu P189 nicht an Position 187 glykosyliert. Die Isolate Duisburg.DEU/10.09, Berlin.DEU/04.08 und Duesseldorf.DEU/10.00 besitzen durch den Austausch von D416 zu N416 eine zusätzliche potentielle Glykosylierungsstelle an Position 416.

Tab. 22: Potentielle Glykosylierungsstellen des H-Proteins untersuchter MV.

Eine zusätzliche Glykosylierungsstelle eines Wildtyp-Virus im Vergleich zum Impfvirus ist blau und der Verlust einer Glykosylierungsstelle ist grau markiert.

MV-Isolat [Genotyp]	Potentielle Glykosylierungsstellen																	
	168			187			200			215			238			416		
	N	S	T	N	C	S	N	M	S	N	V	S	N	L	S	D	L	S
EdmZ [A]																		
EdmS [A]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maryland.USA/0.54 [A]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tuebingen.DEU/24.00 [C2]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/11.10 [B3]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-
Duisburg.DEU/10.09 [D4]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N	-	-
Berlin.DEU/04.08 [D5]	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-
Berlin.DEU/47.00 [D6]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Duesseldorf.DEU/10.00 [D7]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-
Berlin.DEU/10.10 [D8]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Essen.DEU/12.10 [D8]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/44.01 [H1]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-
Sofia.BGR/19.05 [H1]	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	S	-	N	-	-	-

Die Veränderungen in der AS-Sequenz des H-Proteins von Wildtyp-Viren gegenüber Impfviren können zu einem Epitopverlust gegenüber Impf-induzierten neutralisierenden Ak führen und so die durch eine Impfung erworbene Immunität gegenüber MV gefährden. Im Folgenden wurde die Konservierung bzw. Variabilität neutralisierender Epitope des H-Proteins der hier aufgeführten Wildtyp-Viren gegenüber Impfviren untersucht und AS-Austausche, die einen Epitopverlust bewirken können, identifiziert.

5.2. Gewinnung und Charakterisierung MV-neutralisierender und H-spezifischer mAk

EdmZ ist ein typischer Vertreter der weltweit eingesetzten Masernimpfviren. Mit Hilfe von mAk, die gegen dieses Impfvirus induziert worden sind, wurden neutralisierende Epitope des H-Proteins von Wildtyp-Viren im Vergleich zum Impfvirus untersucht. Die Herstellung der mAk erfolgte mit Hilfe der Hybridomtechnologie, bei der B-Lymphozyten immunisierter Mäuse mit Myelomazellen fusioniert werden. Die erzeugten Hybridomzellen produzieren Ak und können über einen sehr langen Zeitraum *in vitro* kultiviert werden. Ak, die von monoklonalen Hybridomzellen produziert werden, werden als mAk bezeichnet.

5.2.1. Präparation eines Antigens zur Immunisierung

Zur Gewinnung von B-Lymphozyten, die MV-spezifische Ak produzieren, wurden Mäuse mit dem inaktivierten Impfvirus EdmZ immunisiert. Für die Herstellung des

Ergebnisse

Antigens zur Immunisierung wurde das Virus zunächst auf Vero Zellen vermehrt (Kap. 4.2.1), anschließend mit β -Propiolacton inaktiviert (Kap. 4.2.2) und nach Aufreinigung in PBS-Puffer aufgenommen (Kap. 4.2.3). Die Wirksamkeit der Inaktivierung wurde durch eine Virustitration (Kap. 4.2.5) überprüft. Dafür wurde inaktiviertes und natives EdmZ in logarithmischen Stufen verdünnt und vier Tage auf Vero Zellen inkubiert. Die in Folge der Infektion ausgebildeten infektiösen Zentren der Virusinfektion im Zellrasen, sogenannte Foci, wurden mit Hilfes eines Colorimetrischen Immunoassays (Kap. 4.2.4) markiert (Abb. 15).

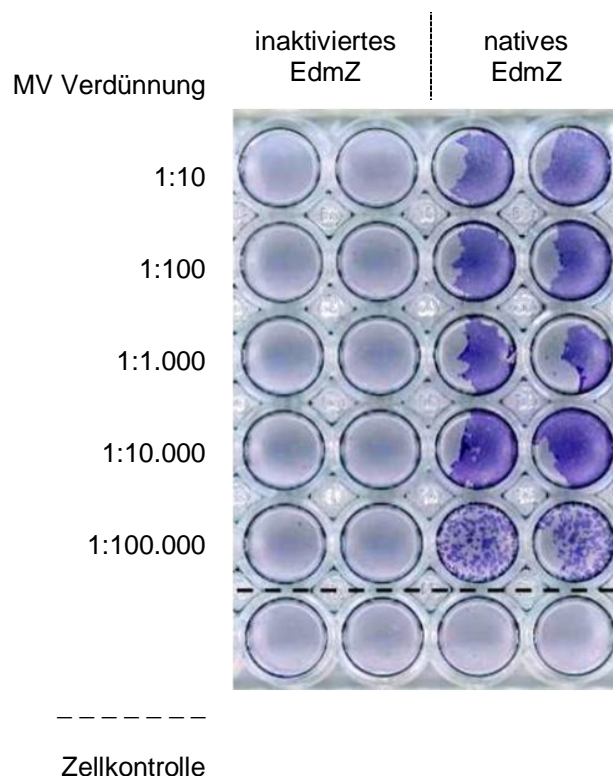


Abb. 15: Titration des inaktivierten und nativen EdmZ auf Vero-Zellen.

Vero-Zellen wurden vier Tage mit inaktiviertem oder nativem EdmZ ($c= 0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) in verschiedenen Verdünnungsstufen inkubiert. MV-spezifische Foci wurden mit einem Colorimetrischen Immunoassay markiert (violett).

Auf Zellen, die mit dem nativen Virus inkubiert wurden, waren die MV-spezifischen Foci anhand ihrer Violettfärbung sichtbar. Infolge der Infektion lösten sich die Zellen, die mit dem nativen EdmZ in einer Virusverdünnung bis zu 1:10.000 inkubiert wurden, teilweise von der Zellkulturplatte. Die Titration der nativen Virussuspension ergab eine Viruskonzentration von $1,53 \times 10^8$ p.f.u./ml. Zellen, die mit der gleichen Menge an inaktiviertem Virus EdmZ inkubiert wurden, zeigten keine MV-spezifischen Foci,

die auf eine Infektion der Zelle und virale Replikation hinweisen. Das Impfvirus EdmZ wurde demzufolge erfolgreich inaktiviert.

Die inaktivierte Virussuspension wurde mittels SDS-PAGE (Kap. 4.4.2) und Western Blot Analyse (Kap. 4.4.3) auf ihren Gehalt an viralen Proteinen untersucht. Dabei konnten die Strukturproteine des inaktivierten Impfvirus in der SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 16a). Das Oberflächenprotein H wurde mit einem H-spezifischen mAk in einer Western Blot Analyse identifiziert (Abb. 16b).

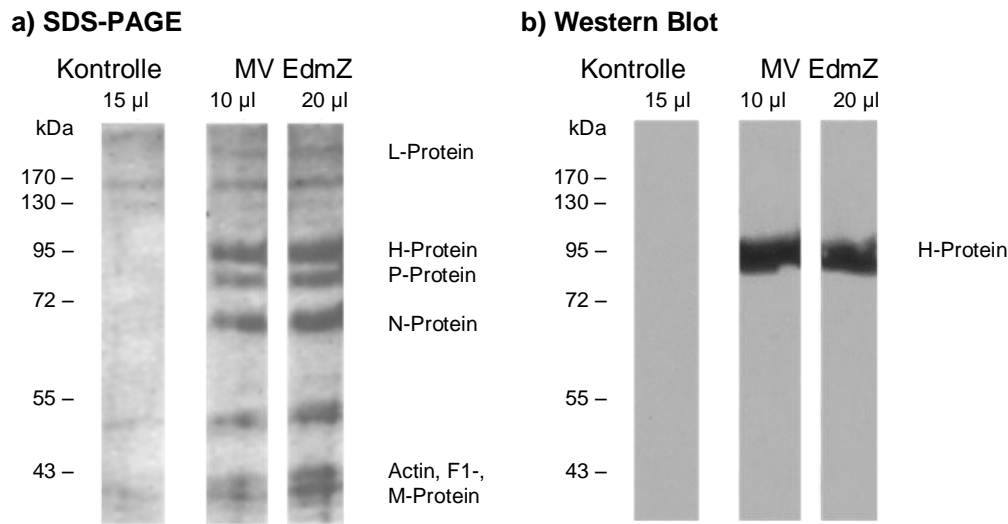


Abb. 16: Nachweis viraler Strukturproteine in inaktivierter Virussuspension.

a) SDS-PAGE: Proteine des inaktivierten EdmZ ($c = 0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden unter reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE (SDS-Gel: 12 %) aufgetrennt und mit *Roti@-Blue* gefärbt. Zellkulturüberstand nichtinfizierter Zellen wurde parallel zur Virusinaktivierung und -aufreinigung mitgeführt und zur Kontrolle ebenfalls in der SDS-PAGE untersucht.

b) Western Blot Analyse: Nach Übertragung der Proteine der SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran wurde das H-Protein mit dem H-spezifischen mAk BH195 als primär eingesetzten Ak nachgewiesen.

5.2.2. Nachweis neutralisierender Antikörper gegen MV im murinen Antiserum

Zur Gewinnung H-spezifischer, MV-neutralisierender mAk wurden zwei Balb/c Mäuse (Maus1, Maus2) mehrfach mit inaktiviertem EdmZ immunisiert (Kap. 4.3.1) und die Entwicklung der humoralen Immunantwort verfolgt. Dafür wurden Serumproben, die vor der ersten Immunisierung (Präimmenserum), zehn Tage nach der zweiten Immunisierung (1. *Boost*-Immunisierung) und am Tag der Herstellung der Hybridomzellen (Zellfusion) entnommen worden waren (Kap. 4.3.1), mit Hilfe eines Neutralisationstests (FRNT, Kap. 4.2.6) auf neutralisierende Ak gegen EdmZ untersucht. Dafür wurden die Seren mit EdmZ inkubiert und die Suspension

anschließend auf CHO-SLAM gegeben. Die MV-spezifischen Foci wurden mit Hilfe eines Colorimetrischen Immunoassays markiert (Kap. 4.2.4) (Abb. 17).

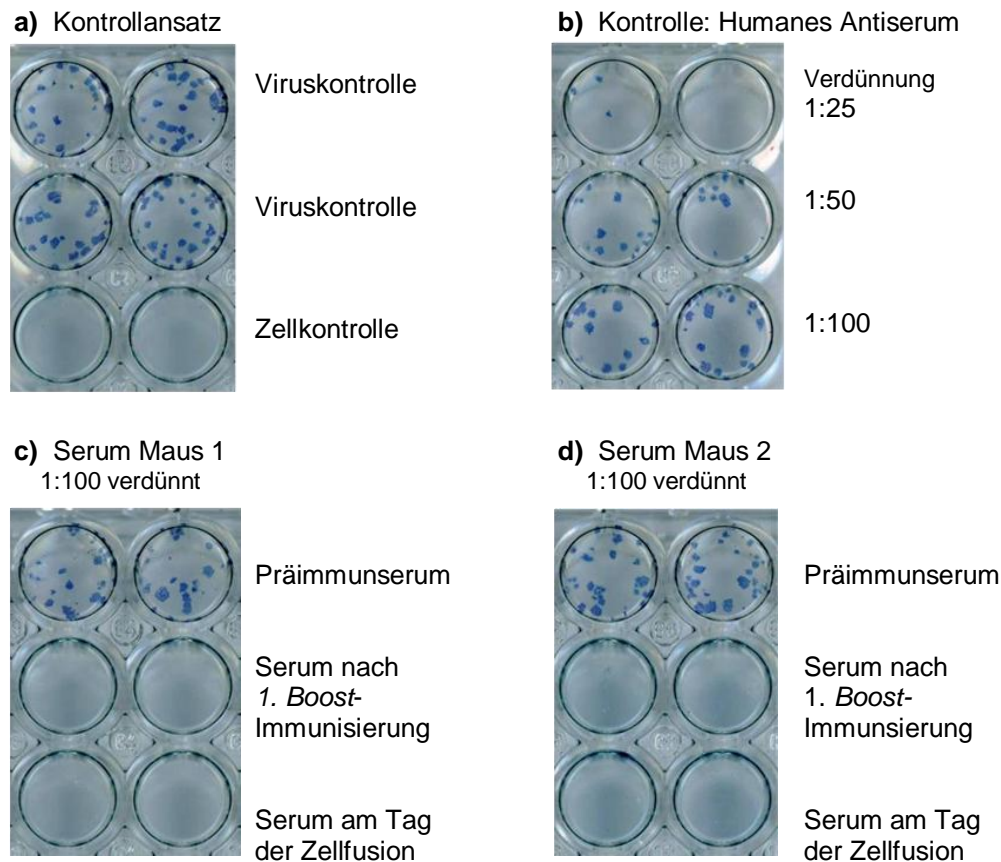


Abb. 17: Nachweis MV-neutralisierender Ak im Mausserum.

In einem FRNT wurden verdünnte Seren mit EdmZ für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf CHO-SLAM Zellen gegeben. Die Zellen wurden für drei Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. MV-spezifische Foci wurden mit einem Colorimetrischen Immunoassay markiert (violett).

a) Viruskontrolle: Infektion der Zellen mit EdmZ ohne vorherige Inkubation des MV mit Seren;
Zellkontrolle: keine Infektion der Zellen mit EdmZ

b) Kontrollansatz: Einsatz eines humanen Antiserums in verschiedenen Verdünnungsstufen

c, d) Untersuchung von Mausseren, welche vor der Immunisierung (Präimmunserum), zehn Tage nach der 1. *Boost*-Immunisierung und am Tag der Zellfusion entnommen worden sind

Im Viruskontrollansatz waren jeweils ca. 30 MV-spezifische Foci sichtbar, die auf eine Infektion der Zelle hinweisen. Zellen der Zellkontrolle zeigten keine Foci, da sie nicht mit Virus inkubiert worden sind (Abb. 17a). In einem Kontrollansatz mit humanem Serum einer geimpften Person wurde deutlich, dass mit Erhöhung der Serumverdünnung (1: 25 bis 1:100) die Anzahl MV-spezifischer Foci ansteigt (Abb. 17b). Die Reduktion der Foci-Anzahl gegenüber der Viruskontrolle weist auf MV-neutralisierende Ak im Serum hin. Die Menge der neutralisierenden Ak sinkt mit steigender Serumverdünnung. Die murinen Präimmunseren bewirkten keine

Reduktion der Anzahl der Foci im Vergleich zur Viruskontrolle (Abb. 17c, d). Im Unterschied dazu wurden bei Einsatz der Seren, die zehn Tage nach der ersten *Boost*-Immunisierung und am Tag der Zellfusion entnommen worden waren, keine MV-spezifischen Foci mehr nachgewiesen (Abb. 17c, d). Diese Seren enthielten folglich EdmZ neutralisierende Ak.

5.2.3. Gewinnung MV-spezifischer mAk

Für die Herstellung von Hybridomzellen wurden B-Lymphozyten aus der Milz der immunisierten Mäuse eingesetzt. Die Milzzellen wurden präpariert, mit Myelomazellen fusioniert und gemeinsam mit Thymuszellen nichtimmunisierter Mäuse in Selektionsmedium kultiviert (Kap. 4.3.2, 4.3.3). Die Thymuszellen stellen den erzeugten Hybridomzellen Wachstumsfaktoren und Stoffwechselprodukte zur Verfügung, die sie für eine optimale Kultur benötigen. Die Thymuszellen und nichtfusionierten B-Lymphozyten und Myelomazellen starben wenige Tage nach der Zellfusion. Währenddessen konnte die Vermehrung der im Vergleich zu den nichtfusionierten Zellen deutlich größeren und lebensfähigen Hybridomzellen unter dem Mikroskop beobachtet werden. Etwa zehn bis zwanzig Tage nach der Zellfusion wurde der Zellkulturüberstand der Hybridomzellen mit einem Neutralisationstest, dem S-FRNT (Kap. 4.3.5), auf neutralisierende Ak gegen EdmZ untersucht (Daten nicht gezeigt). Bei einem Nachweis neutralisierender Ak erfolgte eine Subklonierung der Hybridomzellen um Ak-produzierende Einzelzellklone zu gewinnen (Kap. 4.3.4). Etwa zehn Tage später wurden die Einzelzellklone mit dem S-FRNT auf die Sekretion neutralisierender Ak getestet (Kap. 4.3.5, Daten nicht gezeigt). Die Hybridomzellen, die neutralisierende AK gegen EdmZ produzierten, wurden zur Vermehrung aus der 96-Lochplatte in Zellkulturplatten bzw. -flaschen mit dem nächst größeren Volumen umgesetzt und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Eine Hybridomzelle besitzt einen doppelten Chromosomensatz aus einem B-Lymphozyten und einen doppelten Chromosomensatz aus einer Myelomazelle. Ein Chromosomenverlust während der Zellteilung kann zum Verlust der für die Ak-Produktion notwendigen Gene führen (43). Die Stabilität der Hybridomzellklone hinsichtlich ihrer Ak-Produktion wurde daher wöchentlich mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht (Kap. 4.3.6). Dabei wurden die von den Hybridomzellen gebildeten intrazellulären Ak mit einem fluoreszenzgekoppelten Ak markiert. Die hier exemplarisch gezeigten Histogramme stellen die Zellzahl in

Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität dar (Abb. 18). Die ermittelte Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Menge der Ak in den Hybridomzellen: je mehr Ak produziert werden, umso stärker ist die Fluoreszenzintensität.

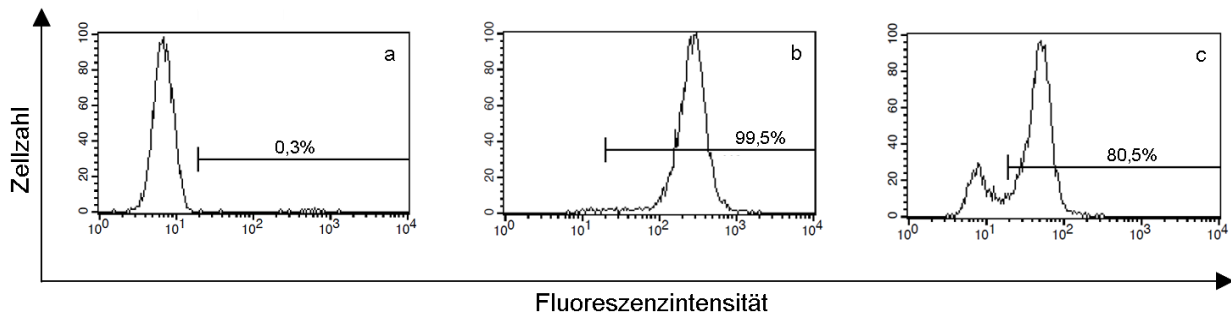


Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse zur Ak-Produktion in Hybridomzellen.

Hybridomzellen wurden permeabilisiert und intrazelluläre Ak mit einem fluoreszenzgekoppelten Ak markiert. Die Messung der Fluoreszenzsignale erfolgte bei 530 nm in FACS Calibur™.

- a) Referenz: nichtmarkierte Hybridomzellen
- b) monoklonale Ak-produzierende Hybridomzellen
- c) Ak-produzierende und nichtproduzierende Hybridomzellen

Nichtmarkierte Hybridomzellen wurden als Referenz eingesetzt (Abb. 18a). Ein Hybridomzellklon, der im Histogramm einen *Peak* auf Höhe der Referenz zeigte, produzierte demzufolge keine Ak. Ein Histogramm mit einem *Peak* bei höherer Fluoreszenzintensität als die Referenz (Abb. 18b) wies auf Ak-produzierende Hybridomzellen hin. Blieb ein solches Ergebnis über mehrere Zellteilungen (ca. 2 Monate) erhalten, wurde dieser Hybridomzellklon als genetisch stabil bewertet. Zeigten sich im Histogramm untersuchter Hybridomzellen zwei *Peaks*, von denen ein *Peak* im Bereich der Referenz lag (Abb. 18c), produzierte nur ein Teil der Zellen Ak. Eine fortschreitende Verminderung des Anteils Ak-produzierender Zellen deutet auf eine genetische Instabilität hin, die einen Rückgang der Ak-Produktion bewirkt. In diesem Fall wurden die Hybridomzellen subkloniert (Kap. 4.3.4) und die Einzelzellklone mit einem S-FRNT (Kap. 4.3.5) auf neutralisierende Ak getestet. Positive Klone wurden vermehrt und erneut auf die Stabilität der Ak-Sekretion getestet.

Aus ca. 4000 getesteten Hybridomzellklonen wurden sieben genetisch stabile monoklonale Hybridomzellklone ausgewählt, die MV-spezifische neutralisierende mAk produzierten. Vier Zellklone wurden aus Lymphozyten der Maus 1 und drei Zellklone aus Lymphozyten der Maus 2 gewonnen (Tab. 23). Nach Vermehrung der

Zellen wurden die mAk über Protein G aufgereinigt und gegen PBS-Puffer dialysiert (Kap. 4.3.7).

Tab. 23: Erzeugte MV-neutralisierende mAk aus Maus 1 und Maus 2.

Maus	mAk
1	RKI-MV-1d
	RKI-MV-9c
	RKI-MV-12b
	RKI-MV-13a
2	RKI-MV-32c
	RKI-MV-33a
	RKI-MV-34c

5.2.4. Reinheit und Individualität der mAk

Die aufgereinigten Ak wurden mittels SDS-PAGE (Kap. 4.4.2) auf Verunreinigungen durch Fremdproteine geprüft. Für jeden mAk waren zwei Signale in der SDS-PAGE erkennbar (Abb. 19). Diese Signale können aufgrund ihres Laufverhaltens im SDS-Gel der leichten (ca. 25 kDa) und schweren Kette (ca. 50 kDa) der Ig-Moleküle zugeordnet werden. Ein im Vergleich dazu schwaches drittes Signal bei ca. 75 kDa (Spur g) ist vermutlich auf eine unvollständige Trennung der leichten und schweren Kette des mAk RKI-MV-34c zurückzuführen. In der SDS-PAGE waren keine Signale sichtbar, die nicht den mAk zugeordnet werden können. Die mAk wurden demzufolge erfolgreich aufgereinigt.

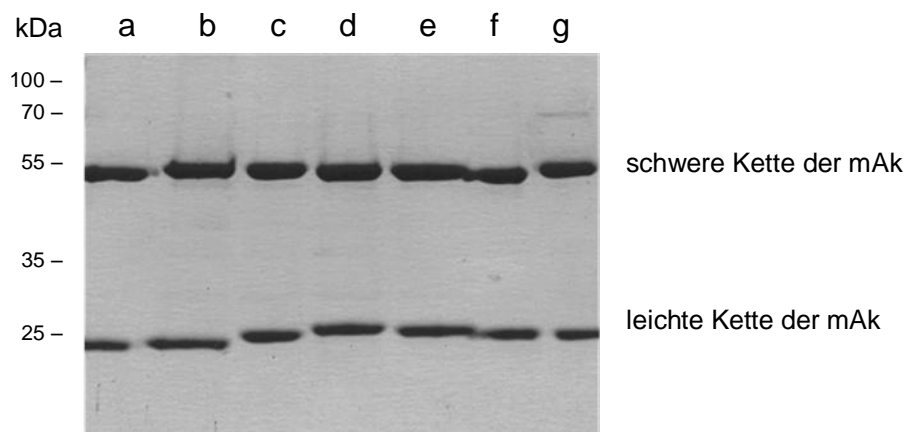


Abb. 19: Reinheit der erzeugten mAk in der SDS-PAGE.

Die erzeugten und Protein G-gereinigten mAk (3 µg) wurden unter reduzierenden Bedingungen mit Hilfe SDS-PAGE (SDS-Gel: 10 %) untersucht. Die Proteine wurden mit *Roti@-Blue* gefärbt.

a) RKI-MV-1d, b) RKI-MV-9c, c) RKI-MV-12b, d) RKI-MV-13a, e) RKI-MV-32c, f) RKI-MV-33a, g) RKI-MV-34c

Ergebnisse

Mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse der mAk (Kap. 4.4.8) wurde untersucht, ob die gewonnen mAk eine individuelle Proteinstruktur besitzen. Die erzeugten Massenspektren zeigten, dass jeder mAk ein einmaliges Peptidfragmentmuster besitzt und sich keines der Peptidfragmentmuster im Spektrum eines anderen mAk wiederholt (Abb. 20). Diese einmaligen Peptidfragmentmuster weisen daraufhin, dass die erzeugten mAk individuell aufgebaut sind.

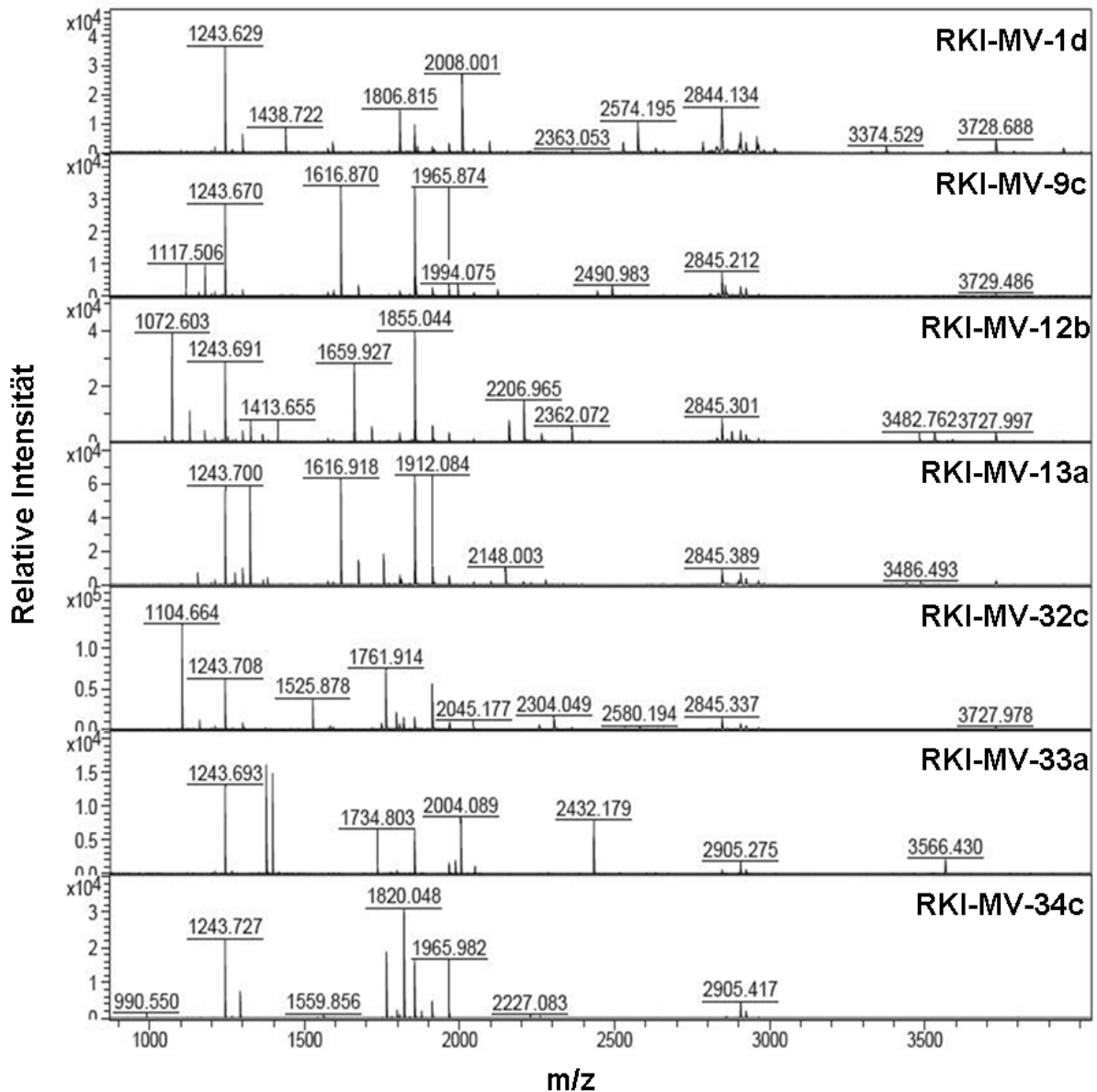


Abb. 20: Peptidfragmentmuster der mAk nach massenspektrometrischer Analyse.

Die mAk wurden in 1,4-Dithiothreit reduziert, mit Iodacetamid inkubiert und mit Trypsin verdaut. Die Peptidfragmente wurden mit *ZipTip*[®]-Spitzen aufgearbeitet und in einer HCCA-Matrix auf ein *MTP 384 Stahltarget T F* aufgetragen. Die Messung erfolgte mit einem MALDI-TOF Autoflex[™] Massenspektrometer. Die gewonnenen Daten wurden in Spektren dargestellt, welche die relative Intensität der Signale in Abhängigkeit des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) der Peptide darstellen.

5.2.5. Isotypbestimmung der mAk

Ak werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt. In der proteinbiochemischen Analytik werden häufig sekundäre Ak eingesetzt, die spezifisch an Ak eines bestimmten Isotyps binden. Für die Auswahl von sekundären Ak in dieser Arbeit wurde der Isotyp der erzeugten mAk bestimmt (Kap. 4.3.8). Alle mAk gehören zur Klasse der IgG1 Moleküle und besitzen, mit Ausnahme des mAk RKI-MV-33a, eine leichte Kette vom Isotyp κ . Der mAk RKI-MV-33a besitzt eine leichte Kette vom Typ λ (Tab. 24).

Tab. 24: Isotyp der erzeugten mAk.

Die Bestimmung des Isotyps erfolgte mit dem *IsoStrip™ Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit*.

mAk	Isotyp
RKI-MV-1d	IgG1 κ
RKI-MV-9c	IgG1 κ
RKI-MV-12b	IgG1 κ
RKI-MV-13a	IgG1 κ
RKI-MV-32c	IgG1 κ
RKI-MV-33a	IgG1 λ
RKI-MV-34c	IgG1 κ

5.2.6. H-Spezifität der mAk

Die Mehrzahl der MV-neutralisierenden Ak in einem Serum binden an das H-Protein. Mit Hilfe einer Immunpräzipitation (IP, Kap. 4.4.4) wurde untersucht, ob die in dieser Arbeit erzeugten mAk ebenfalls an das H-Protein binden. Als Negativkontrolle wurde eine IP ohne Zugabe von EdmZ durchgeführt. Die Präzipitate wurden in einer SDS-PAGE (Kap. 4.4.2) sichtbar (Abb. 21). In beiden IP-Versuchen waren Signale auf Höhe der leichten (ca. 25 kDa) und schweren Ketten (ca. 50 kDa) der Ak zu sehen. Im Gegensatz zum Kontrollansatz (Abb. 21I) trat nach Inkubation der mAk mit dem EdmZ-Lysat ein Signal auf der Höhe des H-Proteins (ca. 90 kDa) auf (Abb. 21II, Spur a – h). Zusätzliche Signale, die von anderen Proteinen des MV stammen könnten, traten nicht auf. Die erzeugten mAk, einschließlich des H-spezifischen Kontrollantikörpers BH17 (Spur h), haben demnach spezifisch an das H-Protein gebunden. Das unspezifische Maus-Gammaglobulin wurde als Negativkontrolle eingesetzt und zeigte keine Bindung an virale Proteine (Spur i).

Ergebnisse

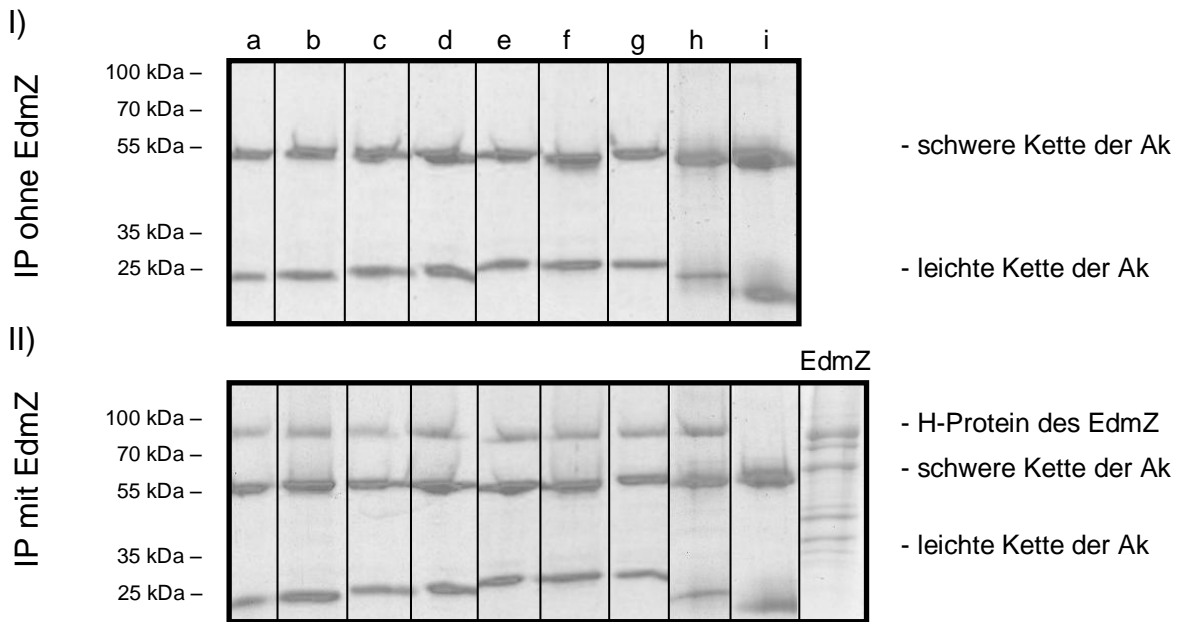
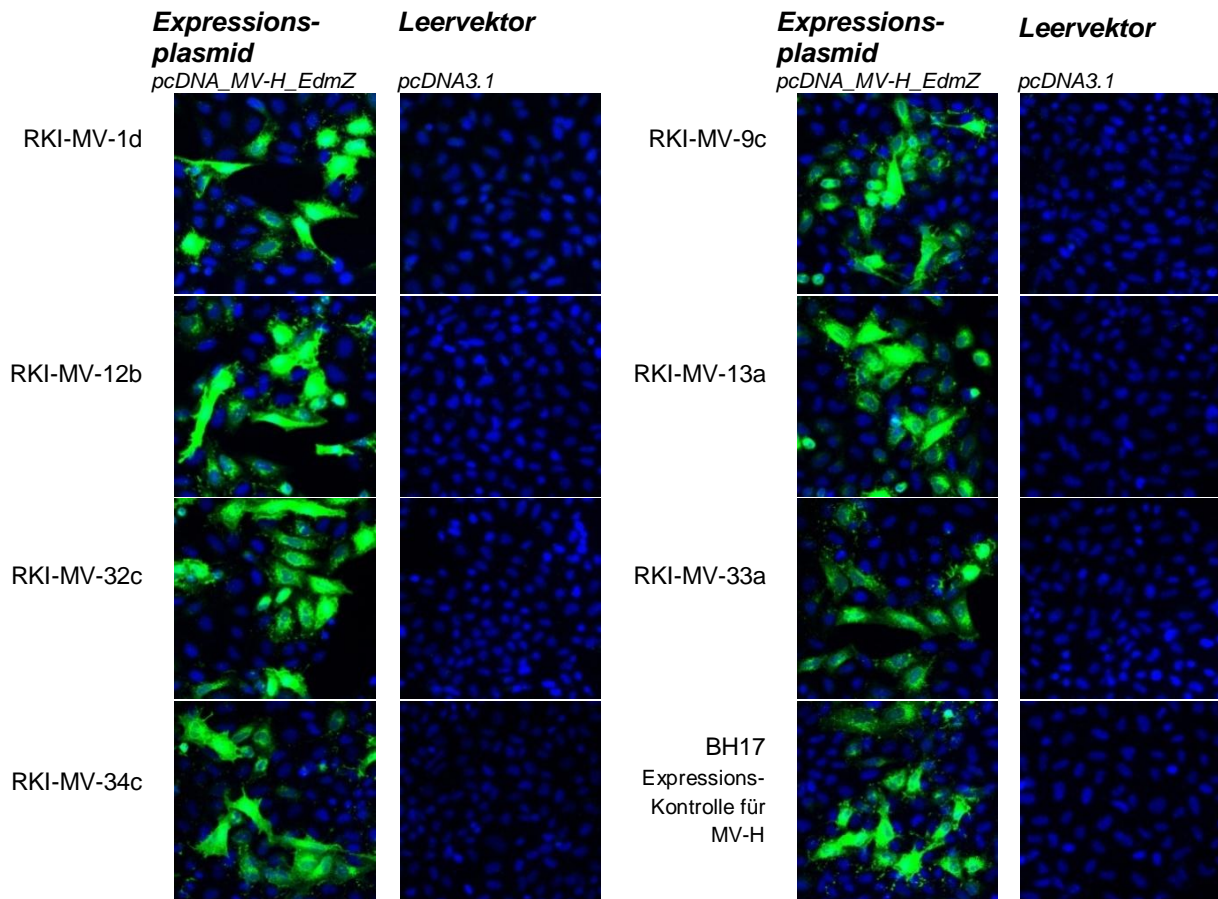


Abb. 21: Bindung der mAk an das H-Protein des MV EdmZ.

EdmZ-Lysat wurde jeweils mit mAk (Spur a - h) und Maus-Gammaglobulin inkubiert (Spur g) (II). Parallel wurden die Ak ohne EdmZ-Lysat inkubiert (I). Die Ak wurden über Protein G-Sepharose präzipitiert und das Präzipitat unter reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE (SDS-Gel: 10 %) aufgetrennt und mit *Roti®-Blue* markiert.

a) RKI-MV-1d, b) RKI-MV-9c, c) RKI-MV-12b, d) RKI-MV-13a, e) RKI-MV-32c, f) RKI-MV-33a, g) RKI-MV-34c, h) BH17, i) unspezifisches Maus-Gammaglobulin, EdmZ) Aufgetragenes EdmZ in der SDS-PAGE

Um die Bindung der mAk an das virale H-Protein mit einem weiteren Test zu bestätigen, wurde ein Immunfluoreszenztest (IFT, Kap. 4.4.6) durchgeführt. Für diesen Test wurden HEK-293G Zellen mit dem Plasmid *pcDNA_MV-H_EdmZ*, welches das H-Gen des EdmZ kodiert, transfiziert. Um unspezifische Bindungen des mAk an die Zellen auszuschließen, wurden HEK-293G Zellen mit dem Leervektor *pcDNA3.1* transfiziert (Kap. 4.1.3). Im Anschluss wurde ein IFT mit jeweils einem der mAk als primärem Ak durchgeführt und am konfokalen Laser Raster Mikroskop (cLSM) ausgewertet. Alle sieben mAk haben an das von den Zellen exprimierte H-Protein gebunden. Eine Bindung der mAk an Zellen, die mit dem Leervektor *pcDNA3.1* transfiziert worden sind, wurde nicht beobachtet (Abb. 22). Diese Ergebnisse bestätigen, dass das H-Protein des MV das Zielprotein der neu generierten neutralisierten mAk ist.



Maßstab: \leftrightarrow 20 μ m

Abb. 22: Bindung der mAk an rekombinantes H-Protein in einem IFT.

HEK-293G Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid *pcDNA_MV-H_EdmZ* oder dem Leervektor *pcDNA3.1* transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. In einem IFT wurden die erzeugten mAk sowie der H-spezifische mAk BH17 (Expressionskontrolle) als primäre Ak und ein fluoreszenzgekoppelter sekundärer Ak eingesetzt (grün). Die DNA der Zellkerne wurde mit DAPI markiert (blau). Die Auswertung erfolgte am cLSM und mit der Software *LSM Image Browser 4.2*.

5.2.7. Bestimmung der Avidität der mAk

Eine Ak-Antigen-Interaktion beruht auf verschiedenen Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräften. Die Gesamtbindungsstärke zwischen Ak und Antigen wird als Avidität bezeichnet. Zur Bestimmung der Avidität der mAk gegenüber dem Edm-Virus wurde Aviditäts-ELISA (Kap. 4.4.7.1) durchgeführt. Zunächst wurden die mAk mit einem Standard ELISA (Kap. 4.4.7) titriert, um die Konzentration zu ermitteln, bei der die Epitope auf einer mit Edm-Viruslysate beschichteten Mikrotiterplatte (MV-Mikrotiterplatte) mit dem jeweiligen mAk abgesättigt sind (Abb. 23). Dieser Versuch

wurde zur Kontrolle auf einer Virus-freien Mikrotiterplatte durchgeführt. Die optische Dichte ΔOD der mAk-Verdünnungen auf der Virus-freien Mikrotiterplatte lag unter 0,03 (Daten nicht gezeigt). Demnach traten keine unspezifischen Bindungen zwischen den mAk und der Mikrotiterplatte auf. Die Sättigungskonzentration der mAk für die MV-Mikrotiterplatte lag zwischen 1,25 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 25). Für die Aviditätsbestimmung wurden die mAk in einer Konzentration von jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Bei dieser Konzentration wurde für alle mAk eine Absättigung der jeweiligen Epitope erreicht und es traten keine unspezifischen Bindungen der mAk auf der Virus-freien Mikrotiterplatte auf.

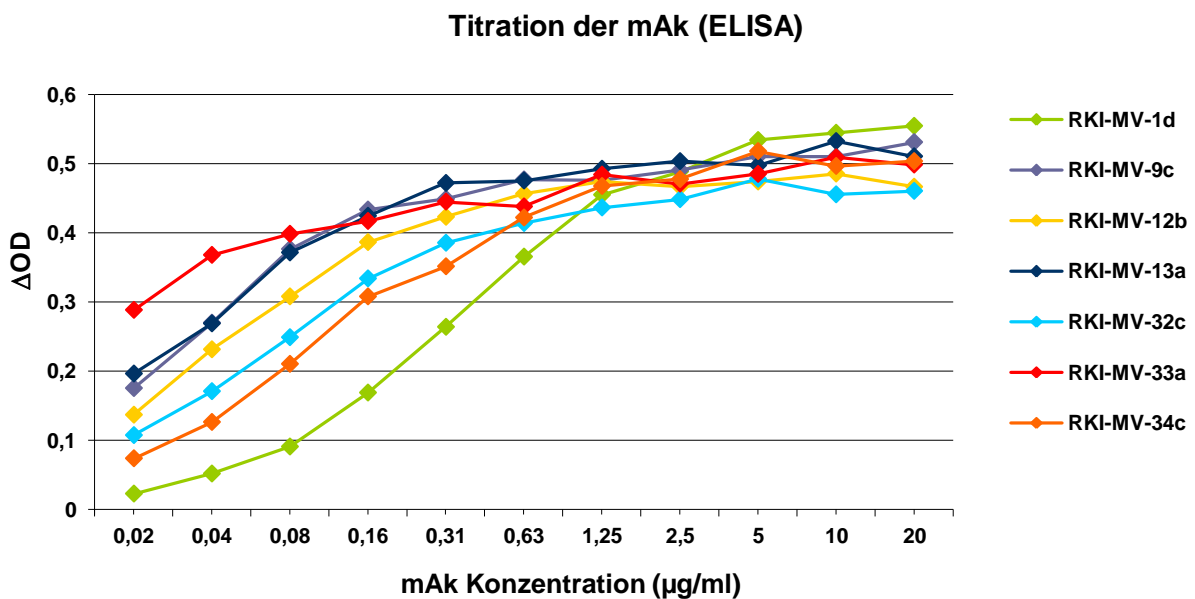


Abb. 23: Titration der mAk auf einer MV-Mikrotiterplatte.

Die mAk wurden in einer Verdünnungsreihe auf einer MV-Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Ak und TMB-Substrat inkubiert. Die folgende Farbreaktion wurde mit H_2SO_4 gestoppt. Die Messung der OD bei 450 nm und 620 nm (Referenzwellenlänge) erfolgte mit dem *FLUOstar Omega Reader*. Das Diagramm zeigt die ΔOD ($\Delta OD = OD_{450\text{nm}} - OD_{620\text{nm}}$) in Abhängigkeit der mAk-Konzentration.

Tab. 25: Sättigungskonzentration der mAk auf einer MV-Mikrotiterplatte.

mAk	Sättigungskonzentration ($\mu\text{g/ml}$)
RKI-MV-1d	20
RKI-MV-9c	20
RKI-MV-12b	1,25
RKI-MV-13a	2,5
RKI-MV-32c	2,5
RKI-MV-33a	10
RKI-MV-34c	10

Die Bestimmung der Avidität der mAk erfolgte mit einem Aviditäts-ELISA (Kap. 4.4.7.1). Das eingesetzte chaotrophe Reagenz Ammoniumthiocyanat (NH_4SCN) stört

die Wechselwirkungen zwischen Antigen und Ak (21) und führt zur Verminderung der Bindung zwischen mAk und MV, infolgedessen die ΔOD abnimmt. Je nach Bindungsstärke sind unterschiedliche Konzentrationen von NH_4SCN nötig, um die Menge gebundener Ak um ein bestimmtes Maß zu reduzieren. Zur Auswertung des Aviditäts-ELISA wurde ein Diagramm mit OD_p , als prozentuales Verhältnis von ΔOD ohne und nach Zugabe von NH_4SCN , in Abhängigkeit der molaren Konzentration des NH_4SCN ($M_{(NH_4SCN)}$) dargestellt (Abb. 24). Die ΔOD in Abwesenheit von NH_4SCN wurde als OD_0 bezeichnet. Der Aviditätsindex (AI), welcher der M_{NH_4SCN} für die Reduktion der OD_0 um 50 % entspricht, wurde über eine lineare Regressionsanalyse im linearen Bereich ermittelt.

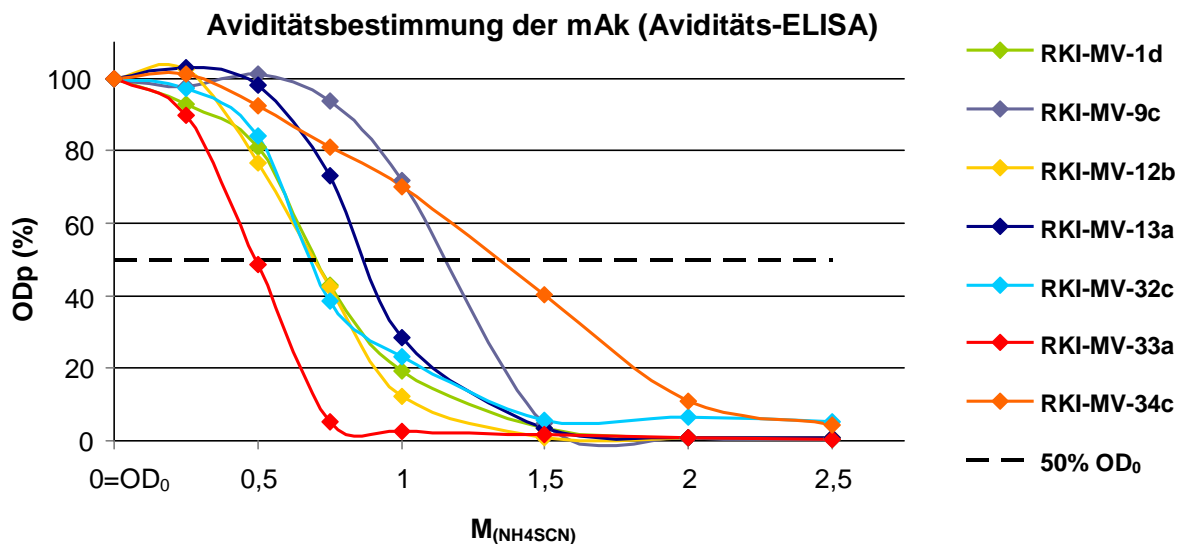


Abb. 24: Bestimmung der Avidität der mAk gegenüber MV in einem Aviditäts-ELISA.

Die mAk ($c= 20 \mu g/ml$) wurden auf einer MV-Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurde NH_4SCN in verschiedenen Molaritäten ($M_{(NH_4SCN)}$) zugegeben. Die MV-Mikrotiterplatte wurde danach mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Ak und TMB-Substrat inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit H_2SO_4 gestoppt und ΔOD bestimmt. Anschließend wurde OD_p berechnet und in Abhängigkeit von $M_{(NH_4SCN)}$ dargestellt.

Der mAk RKI-MV-34c besaß die höchste Avidität (AI= 1,3), gefolgt von RKI-MV-9c (AI= 1,1), RKI-MV-13a (AI= 0,9), und RKI-MV-1d, RKI-MV-12b und RKI-MV-32c (AI= 0,7). Die niedrigste Avidität zum Antigen besaß RKI-MV-33a (AI= 0,5).

5.3. Epitopbestimmung

Ak können lineare Epitope oder Konformationsepitope erkennen. Im Gegensatz zur Struktur eines Konformationsepitopes bleibt eine lineare Epitopstruktur in einer SDS-PAGE erhalten. Während in einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen die Disulfidbrücken des Proteins zu freien Thiolen reduziert werden, bleiben die

Disulfidbrücken eines Proteins in einer SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen erhalten. Für die Identifikation der mAk, die ein lineares Epitop des H-Proteins bzw. ein Epitop in dem eine Disulfidbrücke wesentlich ist erkennen, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Die Proteine des EdmZ wurden zunächst in einer SDS-PAGE jeweils unter reduzierenden und unter nichtreduzierenden Bedingungen (Kap. 4.4.2) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran, wurden die in dieser Arbeit erzeugten mAk als primäre Ak gegen das H-Protein in einer Western Blot Analyse eingesetzt (Kap. 4.4.3). Der H-spezifische Kontrollantikörper BH195 zeigte, dass das reduzierte H-Protein als Monomer (ca. 90 kDa) und das nichtreduzierte H-Protein als Dimer (ca. 190 kDa) vorlag (Abb. 25). Der mAk RKI-MV-1d hat sowohl an das reduzierte als auch das nichtreduzierte H-Protein im Western Blot gebunden (Spur a). Dieses Ergebnis zeigt, dass der mAk RKI-MV-1d an ein lineares Epitop bindet, in dem eine Disulfidbrücke keine wesentliche Rolle spielt. Der mAk RKI-MV-33a reagierte nur mit dem nichtreduzierten H-Protein (Spur f), was darauf hinweist, dass eine oder mehrere Disulfidbrücken die Struktur des Epitopes von RKI-MV-33a aufrechterhalten. Die anderen mAk haben weder an das reduzierte noch nichtreduzierte H-Protein im Western Blot gebunden (Spur b-e, g). Diese Ak erkennen vermutlich Konformationsepitope, deren Struktur sich in der SDS-PAGE verändert hat.

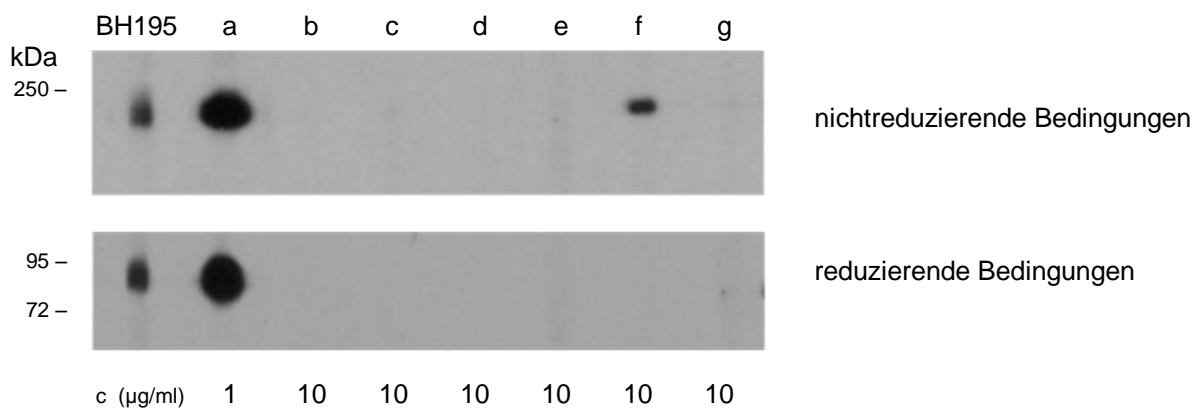


Abb. 25: Bindung der mAk an das H-Protein im Western Blot.

Proteine des EdmZ ($c = 1,9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $28 \mu\text{l}$) wurde unter nichtreduzierenden und reduzierenden Bedingungen in einer Geltasche über die Gelbreite mittels SDS-PAGE (SDS-Gel: 10 %) aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen und fixiert. In einer Western Blot Analyse wurden mit Hilfe eines *Mini-PROTEAN II multiscreen apparatus* die in dieser Arbeit erzeugten mAk neben Kontrollantikörper BH195 als primäre Ak eingesetzt:

a) RKI-MV-1d, b) RKI-MV-9c, c) RKI-MV-12b, d) RKI-MV-13a, e) RKI-MV-32c, f) RKI-MV-33a, g) RKI-MV-34c.

Mit Hilfe eines *PepStarTM Peptide Microarrays* können Epitope lokalisiert werden. Dieser *Peptide Microarray* besteht aus Peptiden, die auf der Oberfläche eines Objekträgers immobilisiert sind. Für die Lokalisation der Epitope der erzeugten mAk wurde die C-terminale Rezeptor-Bindedomäne des H-Proteins von EdmZ als Abfolge von 15mer Peptiden auf einem *Peptide Microarray* präsentiert. Die Peptide überlappten sich um jeweils 11 AS. Zusätzlich wurden modifizierte Peptide der bereits bekannten Epitope *neutralizing epitope* (NE) und *hemagglutinin noose epitope* (HNE) auf dem *Peptide Microarray* präsentiert. Nach Inkubation des *Peptide Microarrays* mit den mAk und einem Cy5-konjugierten sekundären Ak wurde die Intensität der fluoreszierenden Signale bestimmt (Kap. 4.4.5). Je höher die Fluoreszenzintensität ist, umso stärker ist die Bindung zwischen Peptid und mAk.

Der mAk RKI-MV-1d zeigte weder eine spezifische Bindung an die Sequenz-überlappenden Peptide der Rezeptor-Bindedomäne (Daten nicht gezeigt) noch an das NE-Peptid des EdmZ (Abb. 26, a), reagierte jedoch mit vier Varianten des NE-Peptides (Abb. 26, b – e). Die NE-Peptide b, c und d zeigen AS-Austausche gegenüber dem Impfvirus EdmZ, die in Wildtyp-Viren zu finden sind: Alle in dieser Arbeit eingesetzten Wildtyp-Viren, die nicht dem Genotyp A zugeordnet wurden, besitzen im Vergleich zu EdmZ G243 anstatt R243 (Peptid b). Zusätzlich zu diesem Austausch besitzt das Isolat Berlin.DEU/47.00 [D6] P247 anstatt S247 und P249 anstatt L249 (Peptid c). Die eingesetzten Wildtyp-Viren der Genotypen D4, D5, D6 und D8 besitzen zusätzlich zum Austausch von R243 zu G243 den Austausch Y252 zu H252 (Peptid d). Peptid e stellt das NE-Minimalepitop S₂₄₄ELSQLS dar.

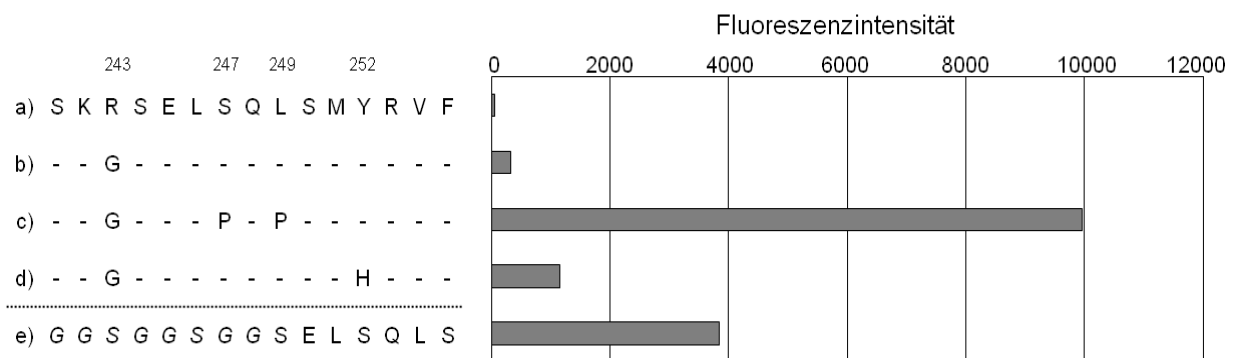


Abb. 26: Bindung des mAk RKI-MV-1d an NE-Peptide.

RKI-MV-1d wurde mit Peptiden des H-Proteins auf einem *PepStarTM Peptide Microarray* inkubiert. Anschließend wurde ein Cy5-konjugierter sekundärer Ak zugegeben und die Intensität der fluoreszierenden Signale bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm mit GenePix 4000B gemessen und mit der Software *GenePix Pro 6.1* ausgewertet. Zwischen dem NE-Minimalepitop SELSQLS und dem *Peptide Microarray* befand sich der zusätzliche Linker GGSGGSGG (kursiv, e).

Die Bindung zwischen dem mAk RKI-MV-1d und dem Peptid c fiel im Vergleich zur Bindung an die NE-Peptide b, d und e stärker aus.

Der mAk RKI-MV-33a ist ebenfalls keine spezifische Bindung mit den überlappenden Peptiden der Rezeptor-Bindedomäne des H-Proteins von EdmZ eingegangen (Daten nicht gezeigt). Der mAk reagierte jedoch mit zwei HNE-Peptidvarianten (Abb. 27 c, f). Die C-C-zyklisierten HNE-Peptide (f – h) besitzen eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen (C). Der mAk RKI-MV-33a reagierte mit dem HNE-Peptid S₃₈₁FQQACKGKIQALCENPEWA, welches eine Disulfidbrücke zwischen C386 und C394 besitzt (f). Lag jedoch keine Disulfidbrücke zwischen diesen Cysteinen vor, so war Intensität des Fluoreszenzsignals geringer und demzufolge die Bindung zwischen mAk und Peptid schwächer (a, c). Der mAk RKI-MV-33a ist keine Bindung mit weiteren HNE-Peptiden eingegangen (b, d, e, g, h).

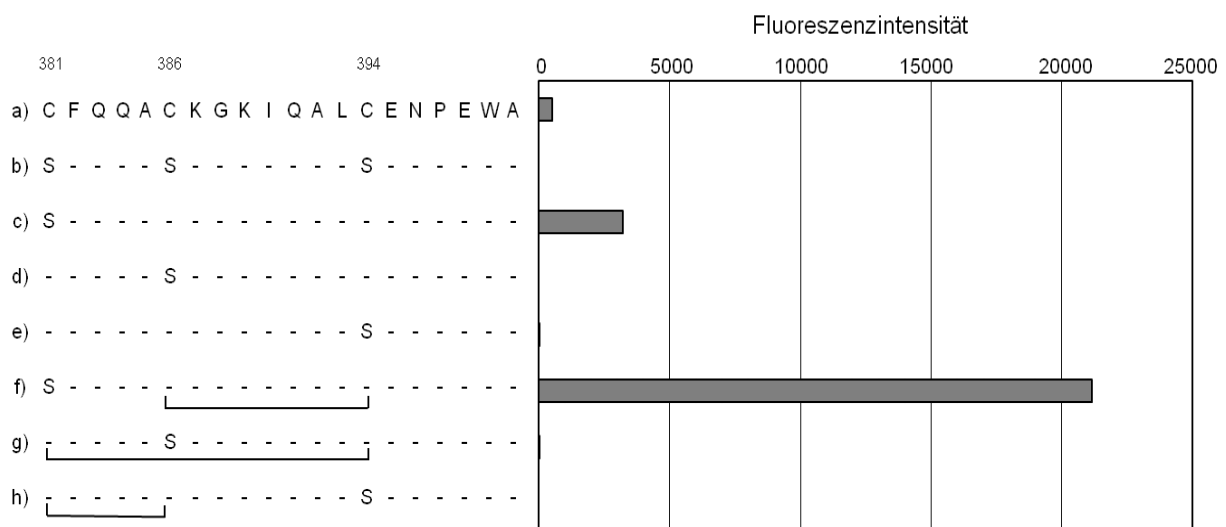


Abb. 27: Bindung des mAk RKI-MV-33a an HNE-Peptide.

RKI-MV-33a wurde mit Peptiden des H-Proteins auf einem *PepStarTM Peptide Microarray* inkubiert. Anschließend wurde ein Cy5-konjugierter sekundärer Ak zugegeben und die Intensität der fluoreszierenden Signale (635 nm) gemessen und ausgewertet. Die Peptide f – h besaßen eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen (C).

Der mAk RKI-MV-34c ist mit den drei Sequenz-überlappenden Peptiden H₃₀₁GEDSITIPYQGSGK, S₃₀₅ITIPYQGSGKGVSF und P₃₀₉YQGSGKGVSFQLVK der Rezeptor-Bindedomäne des H-Proteins von EdmZ eine Bindung eingegangen (Abb. 28). Diesen drei Peptiden ist die Sequenz P₃₀₉YQGSGK gemeinsam. Der mAk RKI-MV-34c ist keine spezifische Bindung mit weiteren Peptiden eingegangen.

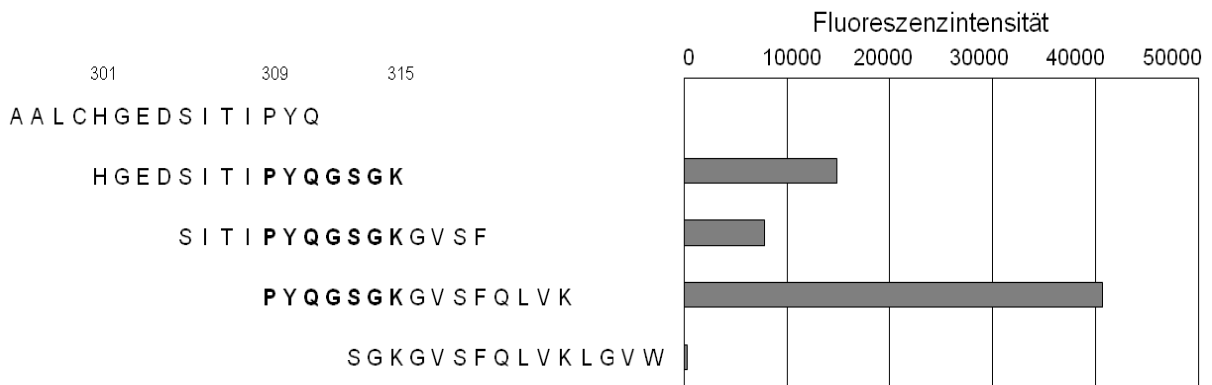


Abb. 28: Bindung des mAk RKI-MV-34c an überlappende Peptide des H-Proteins.

RKI-MV-34c wurde mit Peptiden des H-Proteins auf einem *PepStarTM Peptide Microarray* inkubiert. Anschließend wurde ein Cy5-konjugierter sekundärer Ak zugegeben und die Intensität der fluoreszierenden Signale (635 nm) gemessen und ausgewertet.

Zwischen den mAk RKI-MV-9c, RKI-MV-12b, RKI-MV-13a und RKI-MV-32c und den Peptiden auf dem *Peptide Microarray* fand keine spezifische Bindung statt (Daten nicht gezeigt).

5.4. Rezeptorabhängige Virusneutralisation

Laboradaptierte MV und Impfviren binden über das H-Protein an die drei Wirtszellrezeptoren CD46, SLAM und Nectin-4. Wildtyp-Viren binden ebenfalls an SLAM und Nectin-4, aber nur sehr schwach oder gar nicht an CD46. Neutralisierende Ak können die Bindungsstellen des H-Proteins für den jeweiligen zellulären Rezeptor blockieren und so die Interaktion zwischen dem Virus und der Wirtszelle verhindern. Mit Hilfe eines Neutralisationstestes (FRNT, Kap. 4.2.6) wurde untersucht, ob die MV-neutralisierende Kapazität der erzeugten mAk gegenüber dem Impfvirus EdmZ von der Anwesenheit eines bestimmten MV-Rezeptors auf der Zelle abhängig ist. Für diesen Versuch wurden Zellen eingesetzt, die jeweils nur eines der drei als MV-Rezeptor identifizierten Proteine auf ihrer Oberfläche tragen. Die MV-spezifischen Foci wurden mit Hilfe eines Colorimetrischen Immunoassays markiert (Kap. 4.2.4). Die neutralisierende Kapazität eines mAk wurde als negativ bewertet, wenn eine Ak-Konzentration bis zu 1000 ng/100 µl nicht ausreichte, um die Anzahl der infektiösen MV-Partikel auf 50 % zu reduzieren (Tab. 26, hervorgehoben). In diesem Fall fand eine Infektion der Zelle und eine nachfolgende Ausbildung von MV-spezifischen Foci statt, da das Virus nicht neutralisiert wurde.

Tab. 26: Neutralisierende Kapazität der mAk auf Zellen mit verschiedenen Rezeptoren.

In einem FRNT wurde EdmZ mit mAk inkubiert und auf CHO-SLAM Zellen (SLAM-Rezeptor), Vero Zellen (CD46-Rezeptor) und Calu-3 Zellen (Nectin-4-Rezeptor) gegeben. MV-spezifische Foci wurden nach drei (CHO-SLAM), vier (Calu-3) bzw. fünf (Vero) Tagen mit einem Colorimetrischen Immunoassay markiert und ausgezählt. Als Maß für die neutralisierende Kapazität der mAk wurde der normierte 50 % Foci-Reduktionstiter der mAk berechnet und in ng/100 µl angegeben.

Zelllinie (Rezeptor)	RKI-MV-1d	RKI-MV-9c	RKI-MV-12b	RKI-MV-13a	RKI-MV-32c	RKI-MV-33a	RKI-MV-34c
Vero (CD46)	<50	781	<50	<50	<50	<50	<50
CHO-SLAM (SLAM)	74	396	<50	<50	<50	<50	<50
Calu-3 (Nectin-4)	<62,5	>1000	<50	<50	<50	<62,5	<62,5

Alle mAk, mit Ausnahme des mAk RKI-MV-9c, verhinderten eine Virusinfektion der CHO-SLAM Zellen, Vero Zellen und Calu-3 Zellen (Tab. 26). Die mAk RKI-MV-1d, RKI-MV-12b, RKI-MV-13a, RKI-MV-32c, RKI-MV-33a und RKI-MV-34 blockieren demzufolge die Infektion einer Wirtszelle unabhängig davon, welchen der drei bisher beschriebenen MV-Rezeptoren die Zelle besitzt. Der mAk RKI-MV-9c verhinderte nur die Infektion der Vero und CHO-SLAM Zellen, jedoch nicht der Calu-3 Zellen. Die neutralisierende Kapazität des mAk RKI-MV-9c ist demzufolge abhängig vom zellulären Rezeptor: Eine MV-Infektion wird durch RKI-MV-9c verhindert, wenn die Zellen den Rezeptor CD46 oder SLAM trägt, wohingegen die MV-Infektion einer Zelle, die den Rezeptor Nectin-4 exprimiert, blockiert wird.

5.5. Neutralisierende Kapazität der mAk gegenüber Impf- und Wildtyp-Viren

Unterschiede in der AS-Sequenz des H-Proteins von Wildtyp-Viren im Vergleich zum Impfvirus können zu einem Verlust eines Epitopes gegenüber Impf-induzierten Ak führen. Mit Hilfe eines FRNT (Kap. 4.2.6) und nachfolgendem Colorimetrischen Immunoassays (Kap. 4.2.4) wurde untersucht, ob Unterschiede in der neutralisierenden Kapazität der erzeugten Impf-induzierten mAk sowie des HNE-spezifischen mAk BH216 und des NE-spezifischen mAk BH47 gegenüber den ausgewählten Wildtyp-Viren (Tab. 21) im Vergleich gegenüber den Impfviren EdmZ und EdmS bestehen (Tab. 27). Die Ergebnisse können auf vorhandene konservierte oder variable neutralisierende Epitope hinweisen. Alle mAk neutralisierten die Impfviren EdmZ und EdmS und das Wildtyp-Isolat Maryland.USA/0.54 vom Genotyp A. Die mAk RKI-MV-12b und RKI-MV-34c neutralisierten zusätzlich alle eingesetzten Wildtyp-Viren. Der mAk RKI-MV-1d neutralisierte alle MV mit Ausnahme von Duisburg.DEU/10.09 [D4] und Berlin.DEU/47.00 [D6]. Der mAk RKI-MV-9c

neutralisierte nur die Wildtyp-Isolate Tuebingen.DEU/24.00 [C2], Berlin.DEU/11.10 [B3], Berlin.DEU/47.00 [D6], Essen.DEU/12.10 [D8], Berlin.DEU/10.10 [D8] und Sofia.BGR/19.05 [H1]. Der mAk RKI-MV-13a neutralisierte alle Wildtyp-Viren mit Ausnahme von Sofia.BGR/19.05 [H1]. Der mAk RKI-MV-32c neutralisierte Viren des Genotyps A und zeigte eine geringe neutralisierende Wirkung gegenüber dem Wildtyp-Isolat Duisburg.DEU/10.09 [D4]. Dieser mAk neutralisierte keine weiteren Wildtyp-Isolate. Der mAk RKI-MV-33a neutralisierte alle Wildtyp-Isolate mit Ausnahme von Essen.DEU/12.10 [D8].

Tab. 27: Neutralisierende Kapazität der mAk gegenüber Impf- und Wildtyp-Viren.

Impf- und Wildtyp-Viren wurden mit mAk inkubiert und anschließend auf CHO-SLAM Zellen gegeben. Mit einem Colorimetrischen Immunoassay wurden MV-spezifische Foci markiert. Als Maß für die neutralisierende Kapazität der mAk wurde der normierte 50% Foci-Reduktionstiter der mAk (ng/100 µl) ermittelt.

MV-Isolat [Genotyp]	RKI-MV-1d	RKI-MV-9c	RKI-MV-12b	RKI-MV-13a	RKI-MV-32c	RKI-MV-33a	RKI-MV-34c
EdmZ [A]	74	396	<50	<50	<50	<50	<50
EdmS [A]	621	<250	<50	<50	<50	<50	<50
Maryland.USA/0.54 [A]	214	64	<50	<50	<50	<50	50
Tuebingen.DEU/24.00 [C2]	74	87	<50	<50	>1000	<50	<50
Berlin.DEU/11.10 [B3]	229	<50	<50	312	>1000	<50	<50
Duisburg.DEU/10.09 [D4]	>1000	>1000	<50	<50	429	<50	<50
Berlin.DEU/04.08 [D5]	244	>1000	<50	322	>1000	<50	<50
Berlin.DEU/47.00 [D6]	>1000	<50	<50	221	>1000	<50	<50
Duesseldorf.DEU/10.00 [D7]	99	>1000	<50	172	>1000	<50	<50
Berlin.DEU/10.10 [D8]	99	<50	<50	337	>1000	<50	<50
Essen.DEU/12.10 [D8]	178	<50	<50	125	>1000	>1000	<50
Berlin.DEU/44.01 [H1]	84	>1000	<50	<50	>1000	<50	<50
Sofia.BGR/19.05 [H1]	142	<50	<50	>1000	>1000	<50	<50

Der Befund, dass die mAk RKI-MV-12b und RKI-MV-34c alle eingesetzten MV neutralisieren, deutet daraufhin, dass die von diesen beiden mAk erkannten Epitope konserviert sind. Die Epitope der mAk RKI-MV-1d, RKI-MV-9c, RKI-MV-13a, RKI-MV-32c und RKI-MV-33a sind hingegen bei einigen Viren nicht vorhanden und können daher als variabel bezeichnet werden.

Der HNE-spezifische mAk BH216 neutralisierte alle eingesetzten Isolate mit Ausnahme von Sofia.BGR/19.05 [H1] (39) (Tab. 28). Der NE-spezifische mAk BH47 neutralisierte EdmZ [A], Berlin.DEU/44.01 [H1] und Sofia.BGR/19.05 [H1] (39), jedoch nicht die Isolate Duisburg.DEU/10.09 [D4] und Berlin.DEU/47.00 [D6] (117) (Tab. 28). Diese Ergebnisse zeigen die Variabilität der Epitope HNE und NE.

Tab. 28: Neutralisierende Kapazität der mAk BH216 und BH47 gegenüber MV.

In einem FRNT wurde der HNE-spezifische mAk BH216 und NE-spezifische mAk BH47 mit MV inkubiert und auf CHO-SLAM Zellen gegeben. MV-spezifische Foci wurden mit einem Colorimetrischen Immunoassay markiert und die neutralisierende Kapazität der mAk (ng/100 µl) ermittelt. Ergänzung aus der Literatur: * Finsterbusch *et al.* (39) ** Santibanez *et al.* (117)

MV-Isolat [Genotyp]	BH216 (HNE)	BH47 (NE)
EdmZ [A]	<20*	200*
Duisburg.DEU/10.09 [D4]	-	>1000
Berlin.DEU/47.00 [D6]	<20*	>4000**
Berlin.DEU/10.10 [D8]	<50	-
Essen.DEU/12.10 [D8]	<50	-
Berlin.DEU/44.01 [H1]	<20*	300*
Sofia.BGR/19.05 [H1]	>2000*	600*

5.6. Neutralisierende Kapazität humaner Antiseren gegenüber MV

Antiseren geimpfter Personen beinhalten polyklonale Ak, die gegen verschiedene Proteinstrukturen auf der Oberfläche des Impfvirus induziert worden sind. Sie können Wildtyp-Viren aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten mit dem Impfvirus erkennen und neutralisieren. Ein Verlust eines gemeinsamen neutralisierenden Epitopes auf einem Wildtyp-Virus mit dem Impfvirus kann die neutralisierende Kapazität eines impf-induzierten Antiserums gegenüber dem Wildtyp-Virus vermindern. Die eingesetzten Wildtyp-Isolate Essen.DEU/12.10 [D8], Berlin.DEU/47.00 [D6] und Duisburg.DEU/10.09 [D4] wurden durch jeweils zwei der sieben erzeugten Impf-induzierten mAk nicht neutralisiert (Tab. 27). Die Bestimmung der neutralisierenden Kapazität zehn Impf-induzierter humaner Antiseren (S1 – S10) mit Hilfe eines FRNT (Kap. 4.2.6) und Colorimetrischen Immunoassays (Kap. 4.2.4) sollte Aufschluss darüber geben, ob sich der für diese Wildtyp-Viren ermittelte Epitopverlust im Vergleich zum Impfvirus EdmZ in einer verminderten neutralisierenden Kapazität widerspiegelt. Die für die neutralisierende Kapazität der Impf-induzierten Serumantikörper ermittelten Werte zeigen, dass alle eingesetzten Viren neutralisiert wurden. Die neutralisierende Kapazität war gegenüber den Wildtyp-Viren nicht vermindert (Abb. 29). Der Epitopverlust der eingesetzten Wildtyp-Viren hat demzufolge keinen Einfluss auf die neutralisierende Kapazität Impf-induzierter Antiseren.

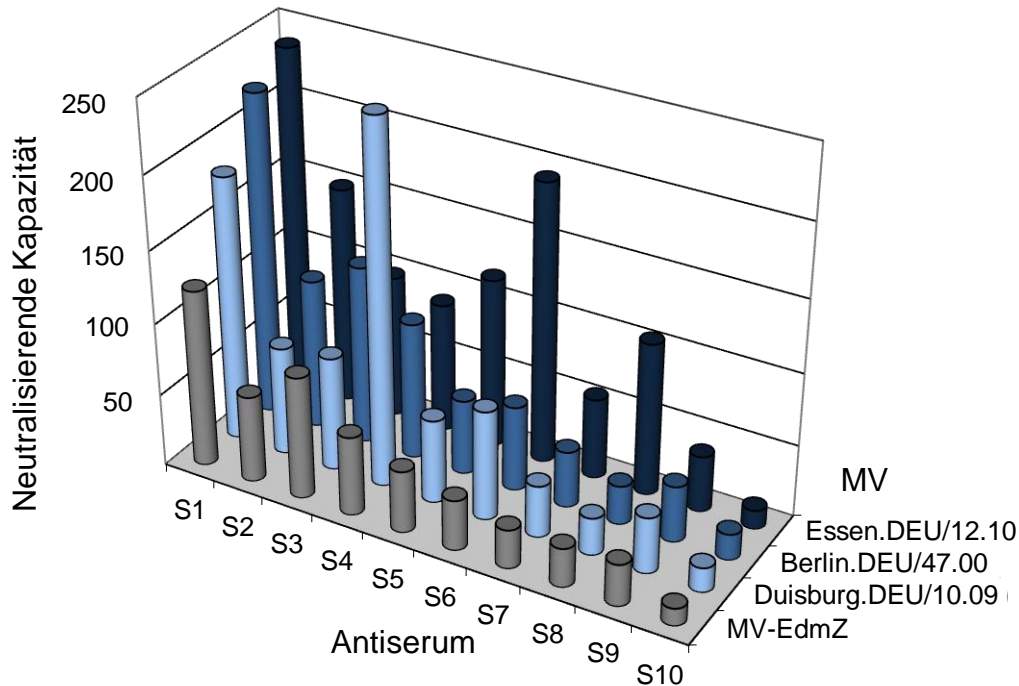


Abb. 29: Neutralisierende Kapazität humaner Impf-induzierter Seren gegenüber MV.

In einem FRNT wurden Seren geimpfter Personen (S1 – S10) mit Essen.DEU/12.10 [D8], Berlin.DEU/47.00 [D6], Duisburg.DEU/10.09 [D4] oder EdmZ [A] inkubiert und auf CHO-SLAM Zellen gegeben. Drei Tage danach wurden die MV-spezifischen Foci mit Hilfe eines Colorimetrischen Immunoassays markiert und ausgezählt. Die neutralisierende Kapazität wurde als reziproke Serumverdünnung angegeben und in Abhängigkeit vom eingesetzten MV für das jeweilige Serum dargestellt.

5.7. Ursachen für einen Epitopverlust von Wildtyp-Viren im Vergleich zum Impfvirus

Die erzeugten Impf-induzierten mAk neutralisierten die Impfviren EdmZ und EdmS. Fünf von der sieben erzeugten mAk neutralisierten nur einen Teil der eingesetzten Wildtyp-Isolate (Tab. 27). Unterschiede in der AS-Sequenz des H-Proteins der Wildtyp-Viren im Vergleich zum Impfvirus können für diesen Epitopverlust verantwortlich sein. Zur Identifikation solcher Mutationen wurden die Sequenzen des H-Proteins bzw. Epitopes der MV miteinander verglichen. In einem Plasmid, welches das H-Gen des Impfvirus EdmZ bzw. des betroffenen Wildtyp-Virus enthielt, wurden die für den Epitopverlust mutmaßlich verantwortlichen AS mutiert. Nach Expression der rekombinanten H-Proteine auf Zellen wurde die Bindung des mAk an das originale und mutierte rekombinante H-Protein mit einem IFT analysiert.

5.7.1. Epitop des mAk RKI-MV-1d – *Neutralizing epitope* (NE)

Der mAk RKI-MV-1d bindet an das bereits bekannte lineare Epitop *neutralizing epitope* (NE), welches sich an Position MV-H_{244–250} befindet (Abb. 26). Dieser mAk neutralisierte alle Impf- und Wildtyp-Viren mit Ausnahme von Duisburg.DEU/10.09 [D4] und Berlin.DEU/47.00 [D6] (Tab. 27). Ein Vergleich der AS-Sequenzen des NE zeigt, dass die Isolate Duisburg.DEU/10.09 und Berlin.DEU/47.00 in diesem Sequenzbereich P249 anstatt L249 und Berlin.DEU/47.00 zusätzlich P247 anstatt S247 besitzen (Tab. 29).

Tab. 29: Vergleich der AS-Sequenzen des NE untersuchter MV.

MV-Isolat [Genotyp]	AS-Sequenz des NE							
	247			249				
	S	E	L	S	Q	L	S	
EdmZ [A]	-	-	-	-	-	-	-	-
EdmS [A]	-	-	-	-	-	-	-	-
Maryland.USA/0.54 [A]	-	-	-	-	-	-	-	-
Tuebingen.DEU/24.00 [C2]	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/11.10 [B3]	-	-	-	-	-	-	-	-
Duisburg.DEU/10.09 [D4]	-	-	-	-	-	-	P	-
Berlin.DEU/04.08 [D5]	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/47.00 [D6]	-	-	-	P	-	P	-	-
Duesseldorf.DEU/10.00 [D7]	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/10.10 [D8]	-	-	-	-	-	-	-	-
Essen.DEU/12.10 [D8]	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/44.01 [H1]	-	-	-	-	-	-	-	-
Sofia.BGR/19.05 [H1]	-	-	-	-	-	-	-	-

Der Einfluss dieser AS-Unterschiede auf die Bindung zwischen dem mAk RKI-MV-1d und dem H-Protein wurde in einem IFT (Kap. 4.4.6) untersucht. Für diesen Versuch wurden zunächst Plasmide konstruiert, die das H-Protein der Isolate Duisburg.DEU/10.09 und Berlin.DEU/47.00 kodieren (Kap. 4.5.7) und zusätzlich in der NE-Sequenz mutiert sind (Kap. 4.5.7.1, Tab. 30).

Tab. 30: NE-Sequenz der erzeugten Plasmide zur Expression des H-Proteins.

Virale RNA wurde aus MV-Partikeln isoliert und cDNA hergestellt. Das H-Gen wurde mittels PCR mit Klonierungsprimern amplifiziert. Das Amplifikat und der Vektor pcDNA3.1 wurden mit Not1 und EcoR1 verdaut und anschließend ligiert und in DH5 α transformiert. Nach Aufreinigung der Plasmide wurde sie sequenziert. Zur Mutation der Plasmide wurde die Plasmid-DNA über eine PCR mit Mutagenese-Primern amplifiziert, mit Dpn1 verdaut und erneut in DH5 α transformiert. Die erzeugten Plasmide wurden aufgereinigt und sequenziert. * Plasmid von Finsterbusch *et al.* (39)

	Plasmid (<i>pcDNA_MV-H_</i>)	AS-Sequenz des NE							
		247			249				
		S	E	L	S	Q	L	S	
Original	<i>EdmZ*</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Mutiert	<i>EdmZ_P247</i>	-	-	-	P	-	-	-	-
	<i>EdmZ_P249</i>	-	-	-	-	-	P	-	-
	<i>EdmZ_P247_P249</i>	-	-	-	P	-	P	-	-
Original	<i>Berlin.DEU/47.00</i>	-	-	-	P	-	P	-	-
Mutiert	<i>Berlin.DEU/47.00_S247</i>	-	-	-	-	-	P	-	-
	<i>Berlin.DEU/47.00_L249</i>	-	-	-	P	-	-	-	-
	<i>Berlin.DEU/47.00_S247_L249</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Original	<i>Duisburg.DEU/10.09</i>	-	-	-	-	-	P	-	-
Mutiert	<i>Duisburg.DEU/10.09_L249</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

HEK-293G Zellen wurden mit jeweils einem dieser Plasmide transfiziert (Kap. 4.1.3). Am folgenden Tag wurden die mAk RKI-MV-1d und RKI-MV-12b (Expressionskontrolle) als primäre Ak in einem IFT eingesetzt (Kap. 4.4.6). Der Kontrollantikörper RKI-MV-12b erkannte das H-Protein auf allen transfizierten Zellen, womit die zelluläre Expression des H-Proteins bestätigt wurde (Abb. 30, Abb. 31). Der mAk RKI-MV-1d hat an das rekombinante H-Protein des Impfvirus EdmZ (S247, L249) gebunden, wohingegen das H-Protein der Isolate Duisburg.DEU/10.09 (S247, P249, Abb. 30) und Berlin.DEU/47.00 (P247, P249, Abb. 31) nicht erkannt wurde. Die Mutation von P249 zu L249 im H-Protein dieser Wildtyp-Isolate ermöglichte die Bindung des mAk RKI-MV-1d. Im Gegenzug verhinderte die Mutation von L249 zu P249 im H-Protein des EdmZ die Bindung von RKI-MV-1d (Abb. 30, Abb. 31). Der Austausch von P247 zu S247 im H-Protein von Berlin.DEU/47.00 ermöglichte keine Bindung von RKI-MV-1d. Erst die zusätzliche Punktmutation von P249 zu L249 im H-Protein von Berlin.DEU/47.00 ermöglichte die Bindung von RKI-MV-1d. Im H-Protein des EdmZ hatte die Mutation von S247 zu P247 keine Beeinträchtigung der Ak-Antigen-Interaktion zur Folge (Abb. 31). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Austausch der AS L249 zu P249 im NE die Bindung des mAk RKI-MV-1d an das H-Protein verhindert.

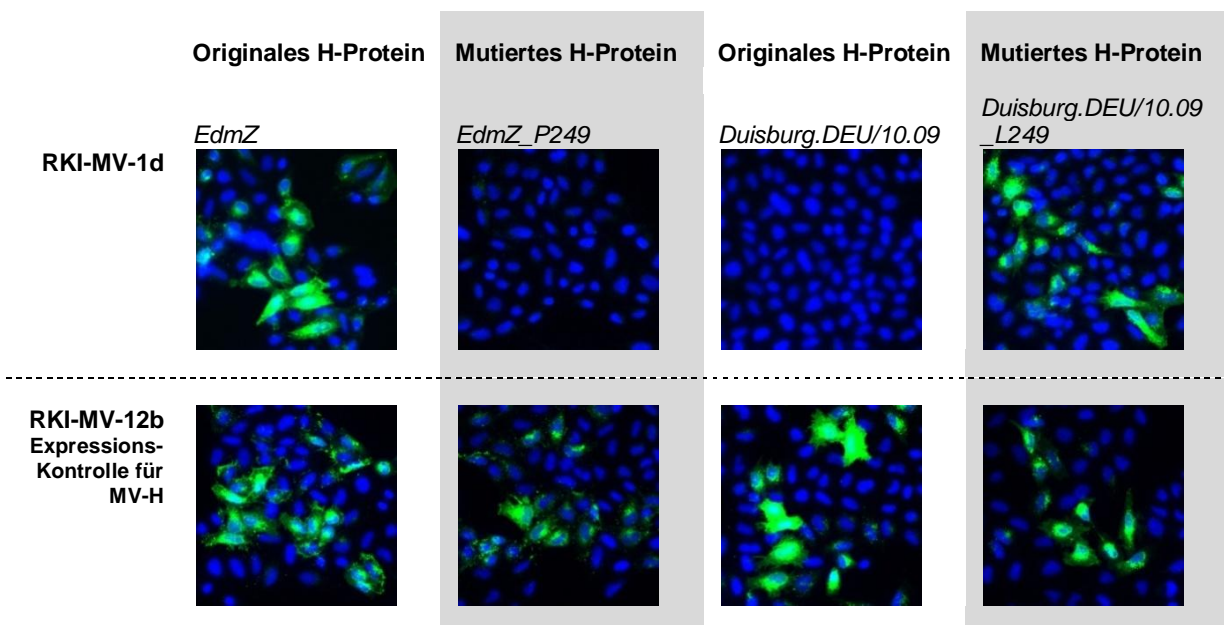
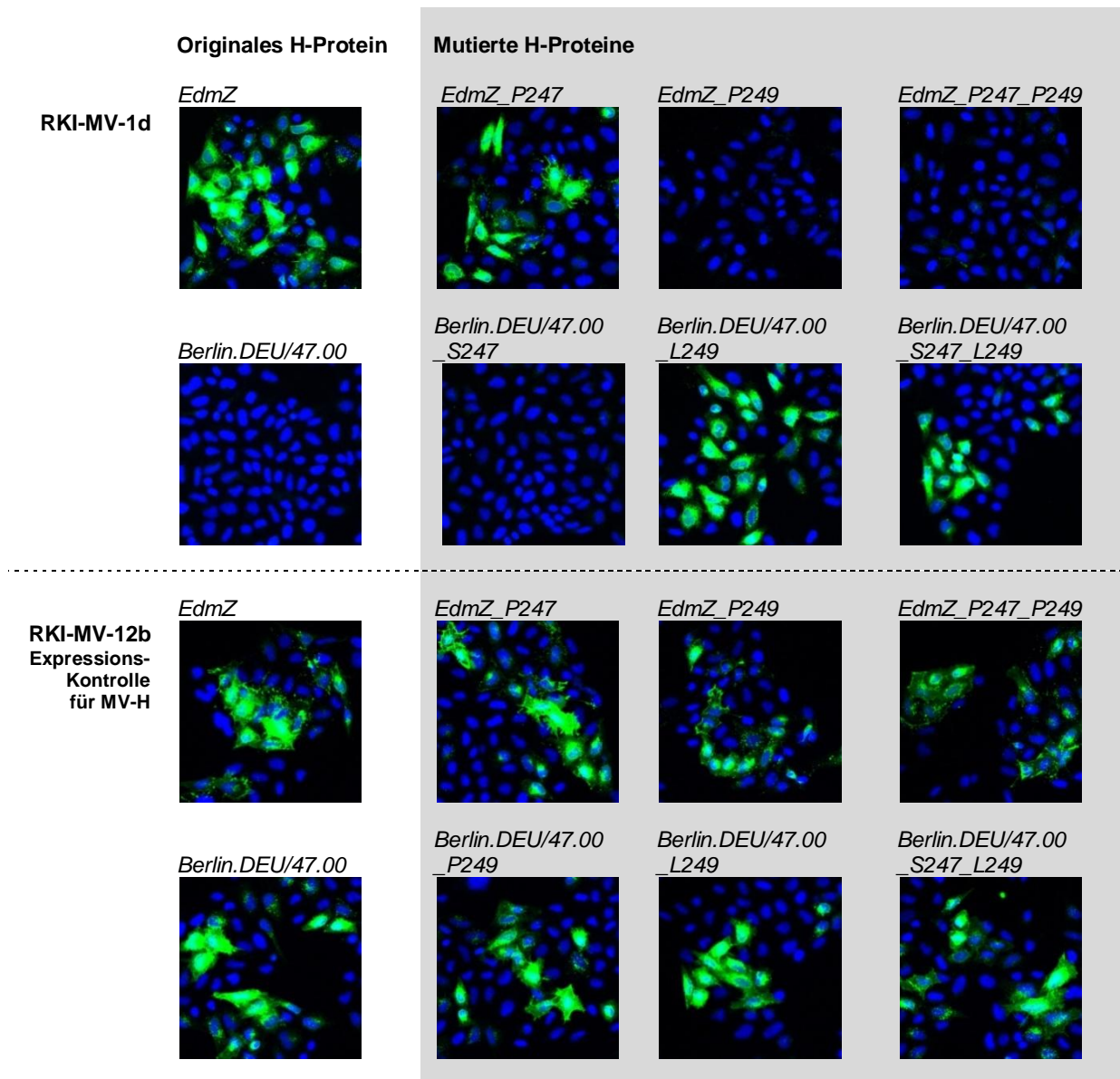


Abb. 30: Bindung des mAk RKI-MV-1d an rekombinantes H-Protein des EdmZ und Duisburg.DEU/10.09.

HEK-293G Zellen wurden mit Plasmiden, die ein originales bzw. mutiertes H-Gen des EdmZ und Duisburg.DEU/10.09 enthielten, transfiziert. In einem IFT wurden RKI-MV-1d und RKI-MV-12b (Expressionskontrolle) als primäre Ak eingesetzt. Die Bindung zwischen dem mAk und dem H-Protein ist grün dargestellt. Die DNA der Zellkerne wurde mit DAPI markiert (blau). Die Auswertung erfolgte am cLSM und mit der Software *LSM Image Browser 4. 2*.



Maßstab: ↔ 20 µm

Abb. 31: Bindung des mAk RKI-MV-1d an rekombinantes H-Protein des EdmZ und Berlin.DEU/47.00.

HEK-293G Zellen wurden mit Plasmiden, die ein originales und mutiertes H-Gen des EdmZ bzw. Berlin.DEU/47.00 enthielten, transfiziert. RKI-MV-1d und RKI-MV-12b (Expressionskontrolle) wurden als primäre Ak in einem IFT eingesetzt. Die Auswertung des IFT erfolgte am cLSM und mit der Software *LSM Image Browser 4. 2*. Die Bindung der mAk an das H-Protein ist grün und die Zellkerne sind blau markiert.

5.7.2. Epitop des mAk RKI-MV-33a – Hemagglutinin noose epitope (HNE)

Das *hemagglutinin noose epitope* (HNE) ist ein neutralisierendes Epitop an Position MV-H₃₈₁₋₃₄₀, welches durch eine Disulfidbrücke zwischen C386 und C384 charakterisiert ist (102, 164). Der mAk RKI-MV-33a hat in einem *PepStarTM Peptide Microarray* ein C-C-zyklisiertes HNE-Peptid (Abb. 27) erkannt und neutralisierte alle im FRNT eingesetzten MV, mit Ausnahme von Essen.DEU/12.10 (Tab. 27). Ein

Sequenzvergleich zeigt, dass Essen.DEU/12.10 im Gegensatz zu den neutralisierten Viren R387 anstatt K387 im HNE besitzt (Tab. 31).

Tab. 31: Vergleich der AS-Sequenz des HNE untersuchter MV.

MV-Isolat [Genotyp]	AS-Sequenz des HNE																			
	387								397											
EdmZ [A]	C	F	Q	Q	A	C	K	G	K	I	Q	A	L	C	E	N	P	E	W	A
EdmS [A]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maryland.USA/0.54 [A]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tuebingen.DEU/24.00 [C2]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V
Berlin.DEU/11.10 [B3]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Duisburg.DEU/10.09 [D4]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/04.08 [D5]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/47.00 [D6]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Duesseldorf.DEU/10.00 [D7]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/10.10 [D8]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T
Essen.DEU/12.10 [D8]	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T
Berlin.DEU/44.01 [H1]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sofia.BGR/19.05 [H1]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-

Mit Hilfe eines IFT wurde untersucht, ob die AS R387 tatsächlich die Interaktion des mAk mit dem H-Protein beeinflusst. Zunächst wurden Plasmide hergestellt (Kap. 4.5.7, 4.5.7.1), die ein mutiertes und unverändertes H-Gen der Viren EdmZ, Berlin.DEU/10.10 und Essen.DEU/12.10 enthielten (Tab. 32).

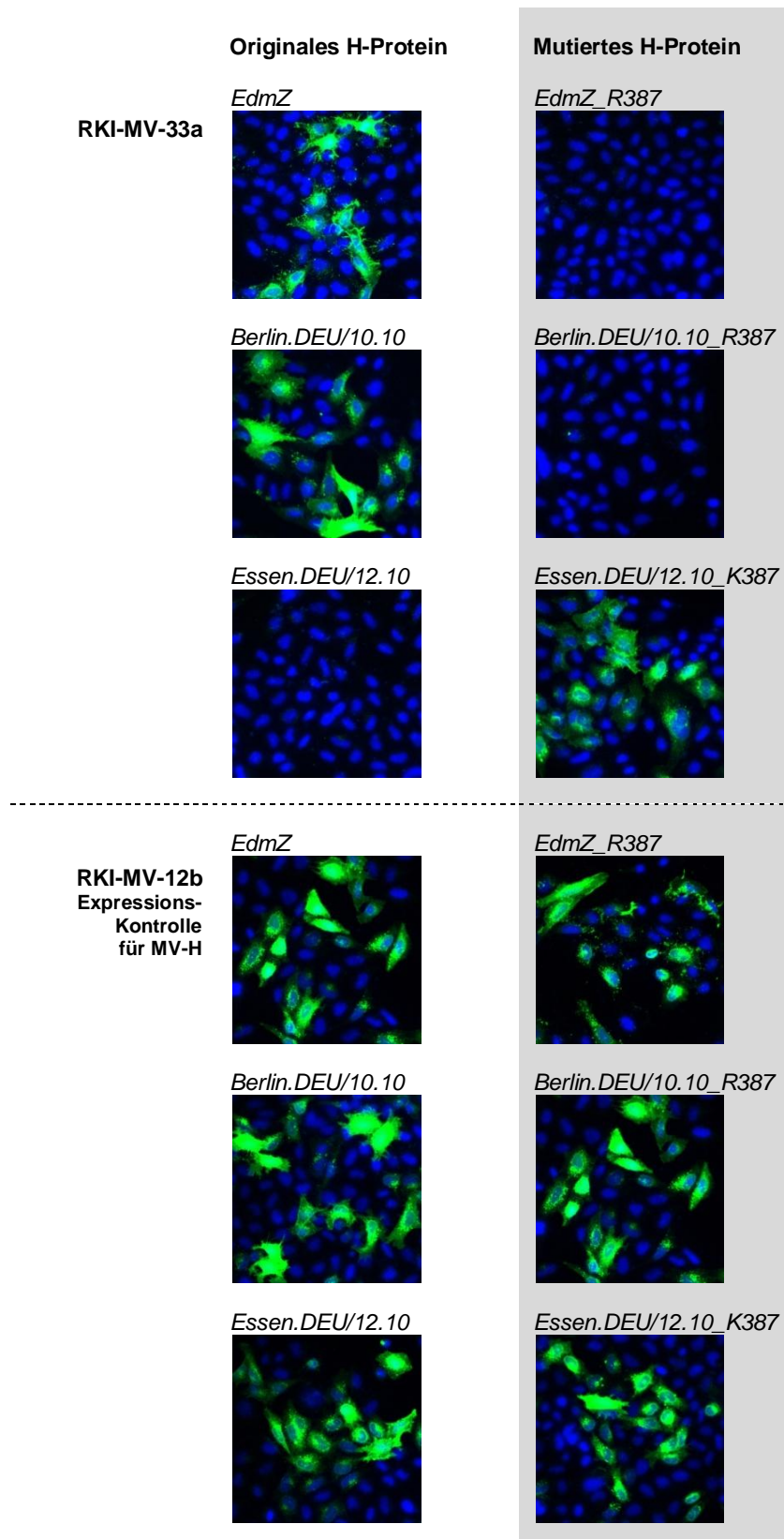
Tab. 32: HNE-Sequenz der erzeugten Plasmide zur Expression des H-Proteins.

Zur Herstellung der Plasmide mit einem H-Gen wurde die cDNA hergestellt und das H-Gen amplifiziert. Die H-DNA und Vektor pcDNA3.1 wurden verdaut, ligiert und in DH5 α transformiert. Die Plasmide wurden aufgereinigt, sequenziert und zusätzlich im HNE mutiert.

*Plasmid von Finsterbusch *et al.* (39)

Plasmid (pcDNA_MV-H_)		AS-Sequenz des HNE																											
		387								397																			
Original	<i>EdmZ*</i>	C	K	G	K	I	Q	A	L	C	E	N	P	E	W	A													
Mutiert	<i>EdmZ_R387</i>	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A												
Original	<i>Berlin.DEU/10.10</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T												
Mutiert	<i>Berlin.DEU/10.10_R387</i>	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T												
Original	<i>Essen.DEU/12.10</i>	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T												
Mutiert	<i>Essen.DEU/12.10_K387</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T												

Nach Transfektion von HEK-293G Zellen mit diesen Plasmiden (Kap. 4.1.3), wurden die Zellen mit den mAk RKI-MV-33a und RKI-MV-12b (Expressionskontrolle) als primäre Ak in einem IFT inkubiert (Kap. 4.4.6).



Maßstab: ↔ 20 µm

Abb. 32: Bindung des mAb RKI-MV-33a an das rekombinante H-Protein des EdmZ, Berlin.DEU/10.10 und Essen.DEU/12.10.

HEK-293G Zellen wurden mit Plasmiden, welche das mutierte oder unveränderte H-Gen des EdmZ, Berlin.DEU/10.10 bzw. Essen.DEU/12.10 enthielten, transfiziert. RKI-MV-33a und RKI-MV-12b (Expressionskontrolle) wurden in einem IFT als primäre Ak eingesetzt. Die Auswertung erfolgte am cLSM und mit der Software *LSM Image Browser 4. 2.*

Die nach Markierung mit dem mAk RKI-MV-12b sichtbaren Signale zeigen, dass alle H-Proteinvarianten in den Zellen exprimiert wurden (Abb. 32). Der mAk RKI-MV-33a erkannte das H-Protein von Berlin.DEU/10.10 (K387) und EdmZ (K387), jedoch nicht von Essen.DEU/12.10 (R387). Die Mutation von K387 zu R387 im H-Protein des EdmZ und Berlin.DEU/10.10 verhinderte die Interaktion von RKI-MV-33a mit dem rekombinanten H-Protein, während die Mutation von R387 zu K387 in Essen.DEU/12.10 die Bindung des mAk an das HNE ermöglichte (Abb. 32).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Austausch der AS K387 zu R387 im HNE die Bindung des mAk RKI-MV-33a an das H-Protein blockiert.

5.7.3. Epitop des mAk RKI-MV-34c

Der mAk RKI-MV-34c neutralisierte alle eingesetzten MV im FRNT (Tab. 27) und erkannte auf einem *PepStarTM Peptide Microarray* die drei überlappenden Peptide H₃₀₁GEDSITIPYQGSGK, S₃₀₅ITIPYQGSGKGVSF und P₃₀₉YQGSGKGVSFQLVK (Abb. 28), welche die Sequenz P₃₀₉YQGSGK gemeinsam haben. Ein Vergleich dieser Sequenz in den eingesetzten MV zeigte, dass alle Isolate innerhalb dieses Abschnittes diese Sequenz aufwiesen, unmittelbar angrenzend jedoch AS-Variationen vorhanden waren (Tab. 33).

Tab. 33: Vergleich der mit RKI-MV-34c interagierenden AS-Sequenz eingesetzter MV.

Der gemeinsame Bereich der drei Peptide, die von RKI-MV-34c auf dem *PepStarTM Peptide Microarray* erkannt wurden, ist hervorgehoben.

MV-Isolat [Genotyp]	AS-Sequenz gebundener Bereiche von RKI-MV-34c																							
	309										315													
	H	G	E	D	S	I	T	I	P	Y	Q	G	S	G	K	G	V	S	F	Q	L	V	K	
EdmZ																								
EdmS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maryland.USA/0.54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tuebingen.DEU/24.00	-	-	D	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/11.10	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Duisburg.DEU/10.09	-	R	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/04.08	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	I	-	-
Berlin.DEU/47.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Duesseldorf.DEU/10.00	-	R	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/10.10	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Essen.DEU/12.10	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin.DEU/44.01	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sofia.BGR/19.05	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Der in den 90er Jahren beschriebene mAk I-29 bindet ebenfalls an die Position MV-H₃₀₉₋₃₁₈ (73, 132). Es wurde gezeigt, dass dieser mAk nicht an Viren bindet, die L313 anstatt S313 und R314 anstatt G314 im H-Protein enthalten (55, 130). In einem

IFT wurde getestet, ob diese Mutationen auch die Bindung des mAk RKI-MV-34c an das H-Protein beeinflusst. Für die Transfektion der Zellen wurde zunächst das Plasmid *pcDNA_MV-H_EdmZ* mutiert (Kap. 4.5.7.1, Tab. 34).

Tab. 34: AS-Sequenz des Epitops von RKI-MV-34c in Expressionsplasmiden.

Das Plasmid *pcDNA_MV-H_EdmZ* wurde über eine PCR mit Mutagenese-Primern im Epitop des mAk RKI-MV-34c mutiert.

*Plasmid von Finsterbusch *et al.* (39)

Plasmid (<i>pcDNA_MV-H_</i>)		Sequenz						
						313		
Original	<i>EdmZ*</i>	P	Y	Q	G	S	G	K
Mutiert	<i>EdmZ_L313</i>	-	-	-	-	L	-	-
	<i>EdmZ_R314</i>	-	-	-	-	-	R	-

Nach der Transfektion von Zellen mit diesen Plasmiden (Kap. 4.1.3) wurden die mAk RKI-MV-12b (Expressionskontrolle) und RKI-MV-34c als primäre Ak in einem IFT eingesetzt (Kap. 4.4.6). Lag L313 anstatt S313 oder R314 anstatt G314 im H-Protein vor, so hat mAk RKI-MV-34c nicht an das rekombinante H-Protein gebunden (Abb. 33). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Mutationen, die eine Interaktion zwischen dem mAk I-29 und dem H-Protein verhindern, auch die Bindung des mAk RKI-MV-34c an das H-Protein blockieren.

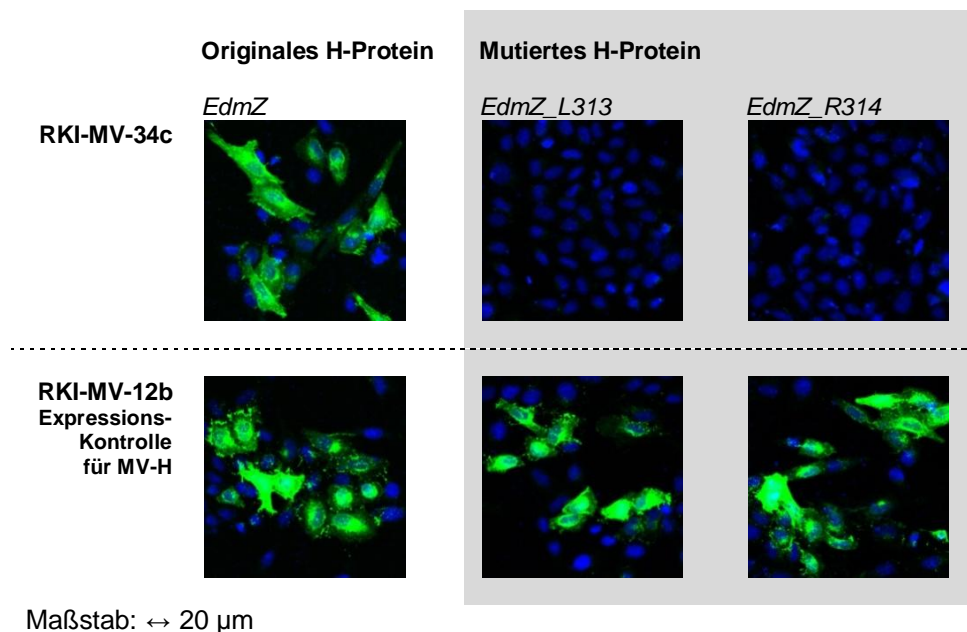


Abb. 33: Bindung des mAk RKI-MV-34c an rekombinantes H-Protein des EdmZ.

HEK-293G Zellen wurden mit Plasmiden, welche das originale und mutierte H-Gen des EdmZ enthielten, transfiziert. In einem IFT wurden RKI-MV-34c und RKI-MV-12b (Expressionskontrolle) als primäre Ak eingesetzt. Die Auswertung des IFT erfolgte am cLSM und mit der Software *LSM Image Browser 4. 2.*

5.7.4. Weitere neutralisierende Epitope

Für die erzeugten mAk RKI-MV-9c, RKI-MV-12b, RKI-MV-13a und RKI-MV-32c konnten mit den in dieser Arbeit angewendeten Methoden keine Epitope ermittelt werden.

Der mAk RKI-MV-12b neutralisierte alle in dieser Arbeit untersuchten MV (Tab. 27) trotz eines breiten Spektrums an H-Sequenzen, welches die aktuell zirkulierenden Genotypen abdeckt. Dies spricht dafür, dass RKI-MV-12b gegen ein konserviertes Epitop gerichtet ist.

Der mAk RKI-MV-9c neutralisierte nicht alle eingesetzten MV (Tab. 27). Die Virusisolate Duisburg.DEU/10.09, Berlin.DEU/04.08 und Duesseldorf.DEU/10.00 wurden nicht neutralisiert und weisen im Gegensatz zu den neutralisierten Viren an Position N416 eine zusätzliche Glykosylierungsstelle auf (Tab. 22). Sie besitzen außerdem A174 anstatt T174. Das Isolat Berlin.DEU/44.01 wurde ebenfalls nicht neutralisiert, besitzt jedoch keine zusätzliche Glykosylierungsstelle an N416. Es enthält im Vergleich zu den anderen Isolaten K475 anstatt R475.

Der mAk RKI-MV-13a neutralisierte mit Ausnahme von Sofia.BGR/19.05 alle untersuchten MV-Isolate (Tab. 27). Sofia.BGR/19.05 unterscheidet sich in sechs AS von den neutralisierten Viren (Tab. 35). Die Mutation von S189 zu P189 führt zum Verlust einer Glykosylierungsstelle an N187 (Tab. 22).

Tab. 35: AS-Variationen des H-Proteins von Sofia.BGR/19.05 [H1] im Vergleich zum H-Protein der durch mAk RKI-MV-13a neutralisierten MV.

AS-Position im H-Protein	Sofia.BGR/19.05 (AS)	Neutralisierte MV (AS)
189	P	S
210	S	L
238	S	N
397	L	P
574	A	D/G
603	E	G

Der mAk RKI-MV-32c neutralisierte die eingesetzten Impfviren und das Wildtyp-Virus vom Genotyp A und zeigt gegenüber Duisburg.DEU/10.09 eine im Vergleich geringe neutralisierende Kapazität. Weitere eingesetzte Wildtyp-Isolate wurden durch diesen mAk nicht neutralisiert (Tab. 27). Ein Sequenzvergleich zeigt, dass Viren vom Stamm Edm im Unterschied zu aktuellen Wildtyp-Viren R243 anstatt G243 besitzen. Duisburg.DEU/10.09 weist jedoch ebenso wie nicht neutralisierte Wildtyp-Viren G243 auf.

6. Diskussion

Die Neutralisation eines Virus durch Ak ist eine wirkungsvolle Komponente der Immunabwehr. MV werden als serologisch monotypisch betrachtet. Epidemiologische Erfahrungen zeigen, dass eine MV-Impfung neutralisierende Ak induziert, die dauerhaft vor einer Infektion mit verschiedenen Wildtyp-Virusvarianten schützen. Daher sollte es möglich sein MV durch Impfung zu eliminieren. Die Mitgliedstaaten der WHO streben die Elimination des Masernvirus (MV) in der WHO Region Europa bis zum Jahr 2015 an. MV-neutralisierende Ak sind hauptsächlich gegen das Oberflächenglykoprotein H gerichtet (22). In dieser Arbeit wurden mit Hilfe neu generierter mAk neutralisierende Epitope des H-Proteins aktueller Wildtyp-Viren im Vergleich zum Impfvirus untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl konservierte als auch variable neutralisierende Epitope auf dem H-Protein der Wildtyp-Viren vorhanden sind. Für die neutralisierenden Epitope *neutralizing epitope* (NE) und *hemagglutinin noose epitope* (HNE) konnten AS-Austausche identifiziert werden, die eine Bindung eines Impf-induzierten Ak an das H-Protein verhindern. Des Weiteren wurde gezeigt, wie sich Seren geimpfter Personen hinsichtlich ihrer neutralisierenden Kapazität gegenüber Wildtyp-Viren verschiedener Genotypen verhalten.

6.1. Die Variabilität des H-Proteins

Das H-Protein liegt auf der Virusoberfläche als Homotetramer vor. Ein H-Monomer besteht aus 617 AS. Ein AS-Austausch in der Sequenz dieses Oberflächenproteins kann sich auf die Struktur bzw. Zugänglichkeit eines neutralisierenden Epitops auswirken. Der Vergleich der AS-Sequenz des H-Proteins zwischen den Impfviren EdmZ und EdmS, dem Wildtyp-Virus Maryland.USA/0.54 [A] und den in Deutschland zirkulierenden Wildtyp-Viren zeigt, dass AS-Variationen vorhanden sind (Kap. 5.1). Die Impfviren EdmZ und EdmS unterscheiden sich um je sechs AS von der H-Sequenz des Wildtyp-Virus Maryland.USA/0.54 [A] (Kap. 5.1). Das Wildtyp-Virus Maryland.USA/0.54 entstammt einer geringen Passage des 1954 isolierten Virus Edm, welches zur Herstellung vieler Impfviren an verschiedene Zelllinien adaptiert und attenuiert wurde (114). Rota *et al.* zeigten, dass sich die Sequenz des H-Gens weiterer Impfviren ebenfalls in einigen AS von ihrem zur Attenuierung eingesetzten

Ausgangsvirus unterscheidet (114). Diese Sequenzunterschiede sind vermutlich während der Adaption des Virus an verschiedene heterologe Zellen entstanden. Die in dieser Arbeit eingesetzten aktuell zirkulierenden Wildtyp-Viren unterscheiden sich in der Sequenz des H-Proteins um 14 – 30 AS vom Impfvirus EdmZ (Abb. 13). Die Ursache für die Sequenzunterschiede können während der Virusreplikation aufgetretene Mutationen sein. Die Mutationsrate von MV wird auf 9×10^{-5} je Base pro Replikation geschätzt (126) und ist vergleichbar mit der Mutationsrate anderer RNA-Viren (27). Die Mutationen im H-Protein können als Reaktion auf einen Selektionsdruck durch neutralisierende Ak verursacht worden sein. Die Durchimpfungsrate betrug im Jahr 2010 in Deutschland 90 – 94 % (30). In einer Population mit Impflücken kann das Virus zirkulieren und Personen mit einem niedrigen Titer an Impf-induzierten Ak infizieren. Diese Personen können nach einer Wildtyp-Infektion bei abgeschwächter Symptomatik MV ausscheiden (20, 147). Die Replikation des Virus findet dabei unter einem Ak-Selektionsdruck statt und kann zur Entstehung von sogenannten *Escape*-Viren führen. *Escape*-Viren sind Viren, die nach einer oder mehreren AS-Mutationen nicht mehr von Ak erkannt werden. Ob das bei Re-Infektionen ausgeschiedene Virus an weitere Personen übertragen wird, ist bisher unklar (50).

Auf der Oberfläche des H-Proteins befinden sich N-gebundene Oligosaccharide. Diese können Epitope maskieren und so die Viren vor einer Neutralisation durch die Ak schützen (46, 113, 117). Einige Wildtyp-Viren zeigen AS-Austausche, die zum Verlust einer Glykosylierungsstelle führen oder Austausch, die im Vergleich zum Impfvirus eine zusätzliche potentielle Glykosylierungsstelle darstellen. Das H-Protein vieler MV wird an den Positionen N168, N187, N200 und N215 glykosyliert und besitzt eine fünfte Glykosylierungsstelle an Position N238, die jedoch nicht glykosyliert wird (54). AS-Austausche im H-Protein der Isolate Berlin.DEU/11.10 [B3], Duisburg.DEU/10.09 [D4], Berlin.DEU/44.01 [H1] und Sofia.BGR/19.05 [H1] führen zu einem Verlust dieser potentiellen Glykosylierungsstelle an N238 (Tab. 22). In der Datenbank GenBank sind mehr als 40 Wildtyp-Viren dokumentiert, die ebenfalls keine potentielle Glykosylierungsstelle an N238 besitzen. Da diese Viren weiterhin zirkulieren, ist anzunehmen, dass die virale Funktion dieser Wildtyp-Viren nicht durch den Verlust dieser potentiellen Glykosylierungsstelle beeinflusst wird. Neben dem Verlust dieser Glykosylierungsstelle wird das Isolat Sofia.BGR/19.05 [H1] nicht an N187 glykosyliert (Tab. 22). Der Verlust eines Glykans kann die Konformation eines

Proteins so beeinflussen, dass Ak nicht mehr an ihre Epitope auf dem Protein binden können (12). Möglicherweise sind aufgrund des verlorenen Glykans an N187 ein oder mehrere neutralisierende Epitope auf dem H-Protein des Isolates Sofia.BGR/19.05 [H1] für Impf-induzierte Ak nicht mehr zugänglich. Die Isolate Duisburg.DEU/10.09 [D4], Berlin.DEU/04.08 [D5] und Duesseldorf.DEU/10.00 [D7] besitzen im Vergleich zum Impfvirus eine zusätzliche Glykosylierungsstelle an N416 (Tab. 22). Für das Isolat Duesseldorf.DEU/10.00 [D7] ist bereits am NRZ MMR gezeigt worden, dass dieses zusätzliche Glykan ein neutralisierendes Epitop maskiert und die Bindung eines Ak an das H-Protein verhindert (117). Dieses Glykan maskiert vermutlich ebenfalls ein neutralisierendes Epitop auf dem H-Protein der Isolate Duisburg.DEU/10.09 [D4] und Berlin.DEU/04.08 [D5]. Dass Veränderungen im Glykosylierungsmuster der Oberflächenproteine Viren vor Ak schützen können, wurde bereits für andere Viren wie Influenzaviren (151) und HIV (152) gezeigt. Eine stetige Veränderung der Oberflächenproteine eines Virus kann den langfristigen Schutz, den ein Impfstoff garantieren sollte, gefährden.

6.2. Eigenschaften der erzeugten mAk

Für die Charakterisierung neutralisierender Epitope des H-Proteins von aktuell zirkulierenden MV im Vergleich zum Impfvirus wurden sieben Impf-induzierte mAk erzeugt und erfolgreich aufgereinigt (Abb. 19). Die massenspektrometrische Analyse der mAk zeigt, dass die mAk individuell aufgebaut sind (Abb. 20). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die zugehörigen erzeugten Hybridomzelllinien aus B-Lymphozyten verschiedener B-Zell-Klone stammen. Die mAk neutralisierten das Impfvirus EdmZ (Tab. 27) und detektierten das rekombinante H-Protein des EdmZ nach ektopischer Expression in einem IFT (Abb. 22). Die weitere Charakterisierung der mAk zeigt, dass die Avidität zum H-Protein (Kap. 5.2.7) nicht mit der MV-neutralisierenden Kapazität korreliert (Tab. 27). Beispielweise besitzt der mAk RKI-MV-9c eine höhere Avidität zum H-Protein, aber eine geringere MV-neutralisierende Kapazität als die mAk RKI-MV-1d, RKI-MV-12b, RKI-MV-13a, RKI-MV-32c und RKI-MV-33a. Vermutlich spielt neben der Bindungsstärke die Lokalisation des Epitopes eine wesentliche Rolle für die Neutralisation des Virus. Je nach Lage des Epitopes können neutralisierende Ak die Interaktion des H-Proteins mit einem Zellrezeptor und/oder die Interaktion mit dem F-Protein blockieren. Für drei generierte mAk

konnten mit Hilfe eines *PepStarTM Peptide Microarrays* die Bindungsstellen bestimmt werden (Kap. 5.3). Die anderen vier mAk erkennen vermutlich neutralisierende Konformationsepitope, welche in dieser Arbeit nicht bestimmt werden konnten. Weiterführende Untersuchungen mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden (58, 95) oder der Kristallstrukturanalyse wären erforderlich um Informationen zur Struktur dieser Epitope zu gewinnen.

6.3. Einfluss der mAk auf die Interaktion zwischen MV und zellulärem Rezeptor

Laboradaptierte MV können Zellen, die einen der drei identifizierten zellulären Rezeptoren für das MV (CD46, SLAM oder Nectin-4) besitzen, infizieren. Wildtyp-Viren können Zellen über die Rezeptoren SLAM und Nectin-4, aber nur selten oder gar nicht über den Rezeptor CD46 infizieren (9). Die mit den drei verschiedenen Rezeptoren interagierenden AS auf dem H-Protein liegen in räumlicher Nähe und werden nicht durch N-Glykane maskiert (47). Diese Bindungsstellen sind ein wichtiges Ziel vieler bisher beschriebener neutralisierender mAk (47) (Abb. 34). Das Größenverhältnis zwischen einem Ak mit ca. 150 kDa und einem H-Monomer mit ca. 90 kDa lässt vermuten, dass auch ein Ak, welcher nur in räumlicher Nähe zur Rezeptorbindestelle an das H-Protein bindet, die Interaktion des H-Proteins mit dem Rezeptor sterisch blockieren kann.

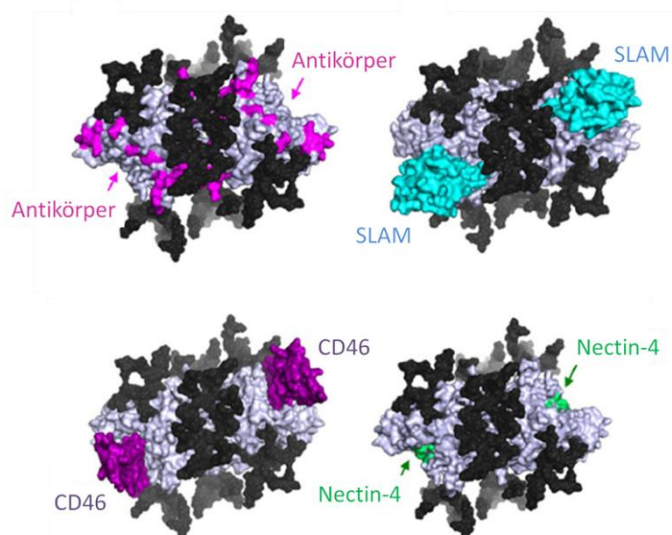


Abb. 34: Modell des H-Proteins mit Bindungsstellen für neutralisierende mAk und Zellrezeptoren. (modifiziert nach Hashiguchi *et al.* (47))

Die farblich markierten Bindungsstellen für bisher veröffentlichte neutralisierende mAk (rot) und die Rezeptoren SLAM (blau), CD46 (violett) und Nectin-4 (grün) liegen in räumlicher Nähe.

Die in dieser Arbeit erzeugten mAk, mit Ausnahme von RKI-MV-9c, verhinderten die Infektion von Zellen, die jeweils einen der drei durch das MV EdmZ erkannten Rezeptoren exprimierten (Tab. 26). Es ist anzunehmen, dass die erzeugten mAk, mit Ausnahme von RKI-MV-9c, direkt an eine der drei Rezeptorbindestellen oder in räumlicher Nähe der Rezeptorbindestellen binden. Ein Sequenzvergleich zeigt, dass die AS-Sequenz des β 5-Faltblattes hoch konserviert ist (Abb. 14). In diesem Bereich befinden sich AS, die mit den Rezeptoren interagieren. Die Rezeptorbindestellen können einen AS-Austausch nicht tolerieren, da sie eine wichtige virale Funktion einnehmen. Hoch konservierte und funktionell essentielle Epitope auf dem H-Protein sind ein ideales Angriffsziel für Ak, da sie eine wirkungsvolle Neutralisation ermöglichen. Impf-induzierte Ak, die an diese Epitope binden, schützen unabhängig von der jeweiligen Wildtyp-Virusvariante vor einer Infektion.

Der mAk RKI-MV-9c blockierte nur die EdmZ-Infektion auf Zellen, die den Rezeptor CD46 oder SLAM besaßen (Tab. 26). Eine EdmZ-Infektion von Zellen mit Nectin-4 wurde durch diesen mAk nicht verhindert. Bei einer Wildtyp-Virusinfektion kann sich das Virus über Zellen des Immunsystems im Organismus systemisch ausbreiten, wobei eine Infektion der Epithelzellen eine lokal begrenzte Infektion des Menschen bedeutet. Epithelzellen besitzen zwar den Rezeptor Nectin-4 (93), exprimieren jedoch kein SLAM. SLAM wird hingegen von vielen Zellen des Immunsystems (z. B. aktivierten Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen) exprimiert (148). Der mAk RKI-MV-9c könnte demzufolge eine systemische Wildtyp-Virusinfektion verhindern, wohingegen er eine lokal begrenzte Infektion der Epithelzellen nicht blockiert.

6.4. Konservierte Epitope des H-Proteins

Zwei der sieben erzeugten mAk neutralisierten alle eingesetzten Wildtyp-Viren (Tab. 27). Dieses Ergebnis zeigt, dass auf dem Oberflächenprotein H konservierte und variable neutralisierende Epitope existieren. Die mAk RKI-MV-12b und RKI-MV-34c neutralisieren alle untersuchten MV. Daher ist anzunehmen, dass diese mAk hoch konservierte Epitope erkennen. Attenuierte Lebendvakzine sowie Peptid-Impfstoffe sollten möglichst neutralisierende Ak induzieren, die hoch konservierte Epitope erkennen und somit vor einer MV-Infektion durch verschiedene Virusvarianten schützen.

6.4.1. Epitop des mAk RKI-MV-12b

Der mAk RKI-MV-12b hat weder im Western Blot an das H-Protein (Abb. 25), noch an Peptide des H-Proteins auf einem *PepStarTM Peptide Microarray* (Kap. 5.3) gebunden. Vermutlich handelt es sich bei dem Epitop dieses mAk um ein Konformationsepitop. Konformationsepitope bestehen aus AS die erst durch Bildung einer räumlichen Proteinstruktur mit einem Ak interagieren können (87). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die mit dem mAk RKI-MV-12b interagierenden AS des H-Proteins zu identifizieren.

6.4.2. Epitop des mAk RKI-MV-34c

Der mAk RKI-MV-34c interagiert im Western Blot nicht mit dem H-Protein (Abb. 25). Auf einem *PepStarTM Peptide Microarray* reagierte dieser mAk mit den sich überlappenden Peptiden H₃₀₁GEDSITIPYQGSGK, S₃₀₅ITIPYQGSGKGVSF und P₃₀₉YQGSGKGVSFQLVK (Abb. 28). Die Sequenz P₃₀₉YQGSGK ist in allen drei Peptiden vorhanden und stellt vermutlich das Epitop dieses mAk dar (Abb. 35).

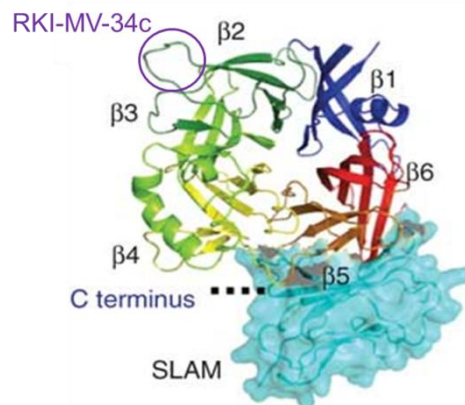


Abb. 35: Epitop des mAk RKI-MV-34c auf dem H-Protein. (modifiziert nach Hashiguchi *et al.* (48))
 RKI-MV-34c bindet an ein Epitop auf dem $\beta 2$ -Faltblatt der C-terminalen Bindedomäne des H-Proteins (violett). Der SLAM-Rezeptor ist hellblau dargestellt.

In den 90er Jahren wurde der schwach neutralisierende mAk I-29 beschrieben, der ebenfalls in diesem Bereich (MV-H₃₀₉₋₃₁₈) an das H-Protein bindet (73, 132). Es wird angenommen, dass der mAk I-29 die Interaktion zwischen dem H- und F-Protein inhibiert (40, 73). Da der mAk RKI-MV-34c die gleiche Bindungsstelle wie I-29 erkennt, inhibiert RKI-MV-34c möglicherweise ebenfalls die Interaktion beider Oberflächenproteine. Die Bindung des H-Proteins an seinen zellulären Rezeptor induziert eine Konformationsänderung, die erst eine Interaktion mit dem F-Protein ermöglicht (48, 91). Möglicherweise blockiert der mAk diese

Konformationsveränderung und verhindert damit die Interaktion zwischen dem H- und F-Protein. Die hohe Konservierung der Epitopsequenz P₃₀₉YQGSGK (Tab. 33) deutet auf eine wichtige virale Funktion hin. *In vitro* Versuche zeigen, dass unter Selektionsdruck des mAk I-29 *Escape*-Viren entstehen können (55). Dabei mutierten die AS S313 zu L313 bzw. G314 zu R314 (55). In einem IFT mit rekombinanten originalen und mutierten H-Proteinen konnte gezeigt werden, dass diese Mutationen auch die Bindung des mAk RKI-MV-34c an das H-Protein verhindern (Abb. 33). Die unterschiedlichen Eigenschaften der Seitenketten der AS des H-Proteins können die Epitopkonformation und damit die Interaktion mit einem Ak beeinflussen. In der natürlichen Umgebung können solche *Escape*-Viren ebenfalls entstehen. Ein Vergleich der Sequenz PYQGL₃₁₃GK mit veröffentlichten AS-Sequenzdaten in der Datenbank GenBank zeigte keine Übereinstimmungen. Es sind MV mit der Sequenz PYQGSR₃₁₄K im H-Protein in GenBank verzeichnet, die jedoch nicht den aktuell zirkulierenden MV zugeordnet werden können (84, 106). Vermutlich können diese Viren ebenfalls nicht durch die mAk RKI-MV-34c bzw. I-29 neutralisiert werden. In Deutschland zirkulierende Viren besitzen keine dieser AS-Austausche, die zu einer Resistenz gegen die mAk RKI-MV-34c bzw. I-29 führen können.

6.5. Variable Epitope des H-Proteins

Fünf der sieben erzeugten mAk neutralisierten nicht alle untersuchten Wildtyp-Viren (Tab. 27). Diese Ak erkennen Epitope auf dem H-Protein, die in einigen der aktuell in Deutschland zirkulierenden Wildtyp-Viren nicht konserviert sind und daher als variabel bezeichnet werden können.

6.5.1. Epitop des mAk RKI-MV-33a – *Hemagglutinin noose epitope* (HNE)

Der mAk RKI-MV-33a hat im Western Blot an das nichtreduzierte H-Protein gebunden. Eine Bindung an das reduzierte H-Protein fand nicht statt (Abb. 25). Offensichtlich spielt eine Disulfidbrücke eine wesentliche Rolle für die Konformation des Epitopes. Mit Hilfe eines *PepStarTM Peptide Microarrays* konnte diese Vermutung bestätigt werden, da RKI-MV-33a an ein C-C-zyklisiertes *hemagglutinin noose epitope* (HNE)-Peptid gebunden hat, welches eine Disulfidbrücke zwischen C386 und C394 besaß (Abb. 27). Das HNE wurde erstmals als Epitop, an welches die mAk BH6, BH21 und BH216 binden, beschrieben (164).

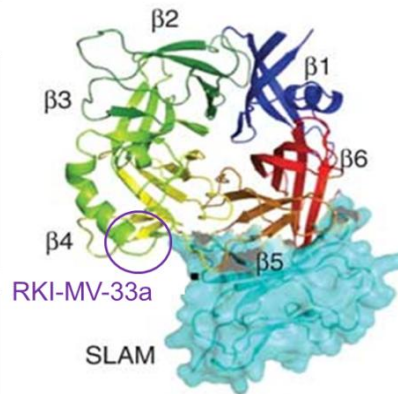


Abb. 36: Epitop des mAk RKI-MV-33a auf dem H-Protein. (modifiziert nach Hashiguchi *et al.* (48))
 Der mAk RKI-MV-33a bindet an das HNE (violett), welches in räumlicher Nähe zur Rezeptorbindestelle liegt. Der MV-Rezeptor SLAM ist hellblau dargestellt.

Die Disulfidbrücke zwischen C386 und C394 ist maßgeblich für die Struktur des HNE verantwortlich (102, 164) (Abb. 37). Nur wenn diese Struktur vorhanden ist, können HNE-spezifische Ak, wie RKI-MV-33a, an das H-Protein binden.

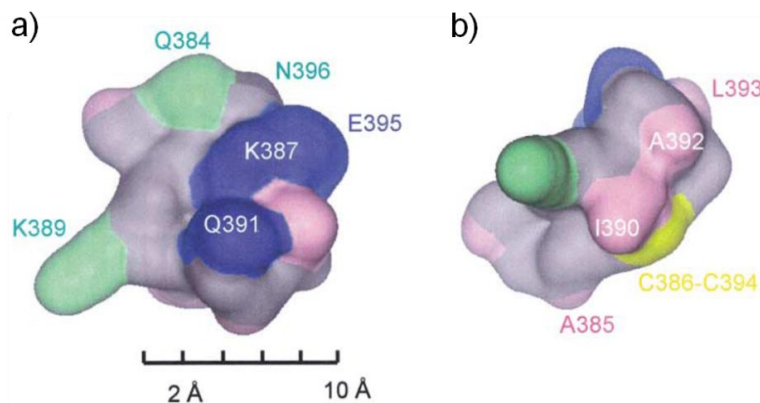


Abb. 37: Model des amphiphilen HNE. (Putz *et al.* (102))
 AS-Seitenketten des HNE sind blau, hydrophile Seitenketten grün, hydrophobe Seitenketten rosa und Disulfidbrücken gelb dargestellt.
 a) Anordnung der geladenen Seitenketten auf der hydrophilen Oberseite des Epitopes.
 b) Anordnung der hydrophoben Seitenketten auf der Unterseite des Epitopes.

Der mAk RKI-MV-33a neutralisierte, mit Ausnahme des Isolates Essen.DEU/12.10 [D8], alle eingesetzten Impf- und Wildtyp-Viren (Tab. 27). Ein Sequenzvergleich und Mutationsversuche identifizierten den Austausch von K387 zu R387 im H-Protein des Isolates Essen.DEU/12.10 [D8] als Ursache für den Verlust des Epitopes, welches durch den mAk RKI-MV-33a erkannt wird (Kap. 5.7.2). Die Seitenketten der AS R und K sind strukturell ähnlich (149). Dennoch verhinderte nur die Seitenkette von R387 die Interaktion zwischen RKI-MV-33a und dem H-Protein. Es wird vermutet, dass die Seitenkette von K387 mit Seitenketten der AS eines Paratops interagiert

und den Ak-Antigen-Komplex stabilisiert (102). Möglicherweise kann die Seitenkette von R387 diese Funktion nicht erfüllen und der mAk RKI-MV-33a daher nicht an das H-Protein binden. In der Datenbank GenBank sind drei weitere Wildtyp-Isolate mit R387 im H-Protein dokumentiert: MVi/Pretoria.SOA/44.95 [D4], MVi/Jhb.SOA/42.96/2 [D4] und MVi/Caen.FRA/04 [B3]. Es ist keine weitere Virusvariante mit R387 aus Deutschland verzeichnet. Neutralisationsversuche (Tab. 28) und Bindungsstudien mit HNE-Peptiden (102) zeigen, dass der mAk BH216 die AS R387 im HNE toleriert. Der mAk BH216 kann jedoch das Isolat Sofia.BGR/19.05 [H1] aufgrund des AS-Austausches von P397 zu L397 im HNE nicht neutralisieren (39). Die AS L397 wird wiederum von dem mAk RKI-MV-33a toleriert (Tab. 27). Beide mAk binden im Bereich des HNE, unterscheiden sich jedoch in ihrem Neutralisationsverhalten gegenüber Wildtyp-Isolaten. Der Austausch einzelner AS kann sich demnach unterschiedlich auf die Bindungsfähigkeit verschiedener neutralisierender Ak auswirken.

Das HNE wird als ein möglicher Kandidat für einen Peptid-Impfstoff für Kleinkinder diskutiert, welcher zusätzlich zum Lebendvakzin eingesetzt werden könnte (164). Es wurde bereits gezeigt, dass HNE-Peptide in Mäusen immunogen sind und Ak induzieren, die vor einer MV-Infektion schützen (101). Aufgrund der auftretenden AS-Variationen in Isolaten wie Essen.DEU/12.10 [D8] oder Sofia.BGR/19.05 [H1] käme nur eine Mischung aus Peptiden, die das HNE mit verschiedenen AS-Austauschen darstellen, für einen Peptid-Impfstoff in Frage.

6.5.2. Epitop des mAk RKI-MV-1d – *Neutralizing epitope* (NE)

Der mAk RKI-MV-1d hat im Western Blot an das reduzierte und nichtreduzierte H-Protein gebunden (Abb. 25). Diese Ergebnisse weisen auf ein lineares neutralisierendes Epitop hin. Mit Hilfe eines *PepStarTM Peptide Microarrays* konnte gezeigt werden, dass der mAk RKI-MV-1d das bereits beschriebene lineare *neutralizing epitope* (NE) erkennt. Der mAk RKI-MV-1d hat das 7mer NE-Peptid S₂₄₄ELSQLS erkannt, aber nicht das diese Sequenz enthaltene 15mer NE-Peptid S₂₄₁KRSELSQLSMYRVF des EdmZ (Abb. 26). Die AS Sequenz S₂₄₄ELSQLS wurde als NE-Minimalepitop für die mAk BH47, BH59, BH103 und BH129 beschrieben (40). Das 7mer NE-Peptid S₂₄₄ELSQLS wurde durch diese vier mAk in einem Peptid-Inhibitions-Assay bis zu fünf Mal stärker inhibiert, als ein 15mer NE-Peptid (40). Andere Studien zeigten ebenfalls, dass kürzere Peptide häufig stärker mit Ak

reagierten, als längere Peptide (73). Die Peptidkonformation eines Antigens kann sich von der natürlichen Struktur im Protein unterscheiden. Dieser Konformationsunterschied ist vermutlich die Ursache, warum der mAk RKI-MV-1d nur das kürzere der beiden Peptide erkannt hat.

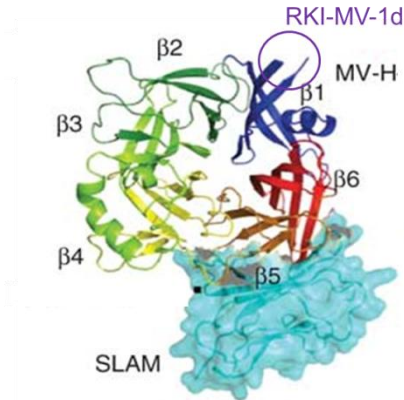


Abb. 38: Epitop des mAk RKI-MV-1d auf dem H-Protein. (modifiziert nach Hashiguchi *et al.* (48))
 RKI-MV-1d bindet an das NE (violett markiert). Der MV-Rezeptor SLAM ist hellblau dargestellt.

Die mAk RKI-MV-1d und BH47 neutralisierten nicht die Virusisolate Duisburg.DEU/10.09 [D4] und Berlin.DEU/47.00 [D6] (Tab. 27). Ein Sequenzvergleich zeigte, dass diese Wildtyp-Isolate P247 anstatt S247 (Berlin.DEU/47.00 [D6]) und/bzw. P249 anstatt L249 (Berlin.DEU/47.00 [D6] und Duisburg.DEU/10.09 [D4]) im NE besaßen (Tab. 29). Mutationsversuche zeigten, dass der AS-Austausch von S247 zu P247 keinen Einfluss auf die Bindung des mAk RKI-MV-1d an das rekombinante Protein hat. Die AS P249 blockiert hingegen die Bindung des mAk an das H-Protein (Abb. 31). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen, die vermuten lassen, dass P247 keine Bindung mit einem NE-spezifischen Ak eingeht (23). Es wird angenommen, dass S247 bzw. P247 im Inneren des Proteins lokalisiert ist und sich die AS E₂₄₅L-QL₂₄₉ auf der für Ak zugänglichen Proteinoberfläche befinden (23) (Abb. 39).

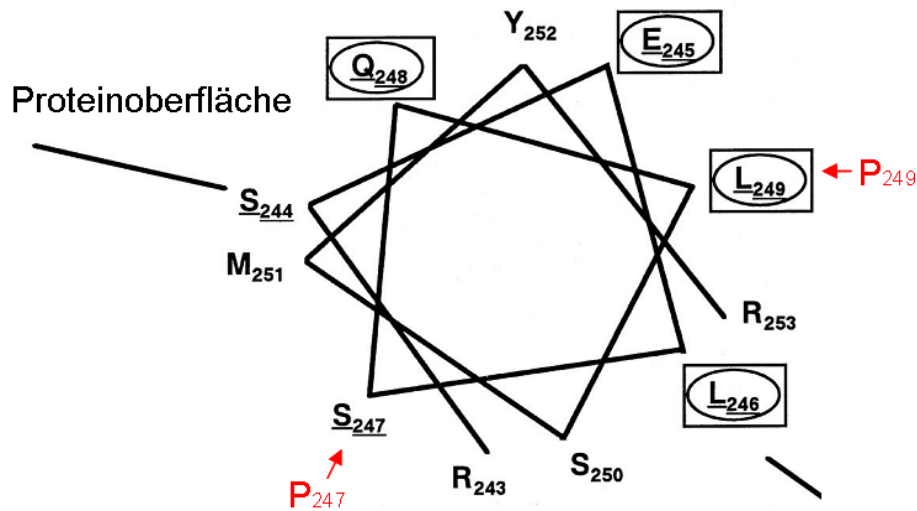


Abb. 39: Strukturmodell des NE. (modifiziert nach Deroo *et al.* (23))

Die AS des NE sind unterstrichen und die vom NE-spezifischen mAk BH129 AS umrandet dargestellt. S247 liegt innerhalb des Proteins und ist für Ak unzugänglich. L249 befindet sich auf der Proteinoberfläche und ist für Ak zugänglich. Eine Mutation von L249 zu P249 (rot) blockiert die Bindung von RKI-MV-1d, während die Mutation von S247 zu P247 (rot) keinen Einfluss auf die Bindung nimmt.

Die AS L249 ist essentiell für die Bindung von Ak an das NE (23). P249 kann aufgrund seiner eingeschränkten Winkel zu einer lokalen Strukturveränderung im Protein führen, die möglicherweise die Ak-Antigen-Interaktion blockiert. In der Sequenzdatenbank GenBank sind MV mit der NE-Sequenz SELSQP₂₄₉S dokumentiert. Diese Viren sind vorrangig vom Genotyp D4. Die Sequenz SELP₂₄₇QP₂₄₉S ist dagegen häufig bei Viren vom Genotyp D6 vertreten. Virusvarianten beider Genotypen zirkulierten innerhalb der letzten zehn Jahre in Deutschland. Bisherige Untersuchungen gehen davon aus, dass das NE mit dem F-Protein interagiert (40). Der mAk RKI-MV-1d blockiert vermutlich ebenso wie der mAk BH47 die Interaktion des H-Proteins mit dem F-Protein. NE gilt als attraktiver Kandidat für Peptid-Impfstoffe, da dieses Epitop linear ist und eine Immunogenität von NE-Peptiden in Mäusen gezeigt werden konnte (31, 40). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist es empfehlenswert für einen Peptid-Impfstoff ein Gemisch aus NE-Peptiden mit den kombinierten AS Variationen P247 und P249, S247 und P249 bzw. S247 und L249 zu verwenden.

6.5.3. Epitop des mAk RKI-MV-13a

Der mAk RKI-MV-13a hat weder im Western Blot mit dem H-Protein (Abb. 25), noch mit H-Peptiden auf einem *PepStarTM Peptide Microarray* reagiert (Kap. 5.3). Er erkennt vermutlich ein Konformationsepitop, dessen interagierende AS sich nicht mit den in dieser Arbeit aufgeführten Methoden bestimmen lassen konnten. Der mAk RKI-MV-13a neutralisierte, mit Ausnahme von Sofia.BGR/19.05 [H1], alle untersuchten Impf- und Wildtyp-Viren (Tab. 27). Ein Sequenzvergleich der H-Proteine zeigte, dass das Isolat Sofia.BGR/19.05 [H1] fünf AS besitzt, die sich von den neutralisierten Viren unterscheiden (Tab. 35). Diese AS-Austausche haben möglicherweise einzeln oder in Kombination einen Einfluss auf die Bindung des mAk RKI-MV-13a an das H-Protein. Der AS-Austausch von S189 zu P189 im H-Protein im bewirkt, dass das Isolat Sofia.BGR./19.05 [H1] im Unterschied zu den neutralisierten Viren kein N-gebundenes Glykan an N187 besitzt (Tab. 22). Diese verlorene Glykosylierungsstelle könnte eine Konformationsänderung des H-Proteins zur Folge haben, die eine Interaktion des mAk RKI-MV-13a mit dem H-Protein blockiert. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese Vermutung zu bestätigen und die Ursache für den Epitopverlust zu finden.

6.5.4. Epitop des mAk RKI-MV-9c

Der mAk RKI-MV-9c reagiert weder mit dem H-Protein im Western Blot (Abb. 25) noch mit H-Peptiden auf dem *Peptide Microarray* (Kap. 5.3). Vermutlich erkennt dieser mAk ein Konformationsepitop. Der mAk RKI-MV-9c neutralisierte nicht die Isolate Duisburg.DEU/10.09 [D4], Berlin.DEU/04.08 [D5], Duesseldorf.DEU/10.00 [D7] und Berlin.DEU/44.01 [H1] (Tab. 27). Die Isolate Duisburg.DEU/10.09 [D4], Berlin.DEU/04.08 [D5] und Duesseldorf.DEU/10.00 [D7] besitzen ein zusätzliches N-Glykan an N416. Diese zusätzliche Glykosylierung maskiert mindestens ein neutralisierendes Epitop (117). Möglicherweise schützt sie das Virus vor einer Neutralisation durch den mAk RKI-MV-9c. Das Isolat Berlin.DEU/44.01 [H1] enthielt jedoch ebenso wie die neutralisierten Viren kein Glykan an N416. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um das Epitop des RKI-MV-9c zu lokalisieren und die Ursache für den Epitopverlust zu ermitteln.

6.5.5. Epitop des mAk RKI-MV-32c

Der mAk RKI-MV-32c reagiert weder mit dem H-Protein im Western Blot (Abb. 25) noch mit H-Peptiden auf dem *Peptide Microarray* (Kap. 5.3). Dieser mAk neutralisierte die eingesetzten Impfviren und das Wildtyp-Virus vom Genotyp A effektiv und das Genotyp D4-Isolat Duisburg.DEU/10.09 [D4] schwach (Tab. 27). Wildtyp-Viren vom Genotyp A zirkulieren seit Jahren nicht mehr. Vermutlich bindet dieser mAk an ein Konformationsepitop, welches sich während der Ausbildung neuer Genotypen verändert hat. In Gebieten mit hoher Inzidenz ist häufig unklar, ob eine kurz nach einer Impfung auftretende Masernerkrankung durch Impfviren oder Wildtyp-Viren verursacht wurde. Dieser Ak wäre ein Kandidat für einen diagnostischen Test zur Unterscheidung zwischen Impfviren und aktuell zirkulierenden Wildtyp-Viren.

6.6. Effizienz aktueller Impfviren

EdmZ und EdmS sind häufig eingesetzte Impfviren. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Impf-induzierte mAk nicht alle Wildtyp-Viren neutralisieren können. In einem weiteren Neutralisationsversuch wurde untersucht, ob dieser Epitopverlust einen Einfluss auf die neutralisierende Kapazität humaner Impf-induzierter Antiseren hat. Die neutralisierende Kapazität von Seren zehn geimpfter Personen gegenüber dem Impfvirus EdmZ und den drei Wildtyp-Viren Duisburg.DEU/10.09 [D4], Berlin.DEU/47.00 [D6] und Essen.DEU/12.10 [D8], die von jeweils zwei der sieben erzeugten mAk nicht neutralisiert wurden (Tab. 27), wurde bestimmt (Abb. 29). Neben dem Impfvirus wurden auch die drei Wildtyp-Isolate durch die Impf-induzierten Serum-Ak neutralisiert. In einem Antiserum sind neutralisierende Ak gegen verschiedene virale Epitope vorhanden. Nach der Theorie des Ersten Antigen-sündenfalls (*Origin antigenic sin*) werden bei einer Infektion vorrangig Ak gegen die Epitope gebildet, welche das Virus mit dem der Erstinfektion gemeinsam hat (38). Obwohl Unterschiede in den Epitopen zwischen Impf- und Wildtyp-Viren vorhanden sind, gibt es ausreichend gemeinsame Epitope, die von den Impf-induzierten Antiseren erkannt werden. Bisher veröffentlichte Studien zum Neutralisationsverhalten Impf-induzierter Serumantikörper gegenüber Wildtyp-MV zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Einige Studien können das Ergebnis dieser Arbeit bestätigen und zeigen ebenfalls keine Abnahme der neutralisierenden

Kapazität Impf-induzierter Antiseren gegenüber Wildtyp-Viren im Vergleich zur neutralisierenden Kapazität gegenüber Impfviren (39, 117). Andere Studien zeigen hingegen, dass die neutralisierende Kapazität von Impf-induzierten Seren gegenüber Wildtyp-Viren im Vergleich gegenüber dem Impfvirus vermindert sein kann (62, 133). Impfversagen werden in primäre (*primary vaccine failure*, PVF) und sekundäre Impfversagen (*secondary vaccine failure*, SVF) unterteilt. Ein PVF zeichnet sich durch fehlende Serokonversion nach einer Impfung aus. Die geimpfte Person baut keine ausreichende Immunität auf. Bei einem SVF wird eine Immunität gegen das Antigen aufgebaut, die jedoch nicht dauerhaft vor einer Infektion mit diesem Pathogen schützt. Ursachen sind beispielsweise der zeitliche Abbau der Immunantwort oder eine graduelle Veränderung des Pathogens, sodass es nicht mehr von Impf-induzierten Ak erkannt wird. Bisher sind nur wenige Fälle von SVF nach Masernimpfungen bekannt. Eine Metaanalyse über viele veröffentlichte SVF Studien zeigt, dass die Rate der Impfdurchbrüche insgesamt unter 0,2 % liegt (6). Häufig zeigen Studien über große Masernausbrüche, wie beispielsweise 2006 in Duisburg (157), dass die Wirksamkeit der Impfungen sehr hoch (92 – 99,4 %), aber die Durchimpfungsrate zu niedrig war, um diese Ausbrüche zu verhindern.

Masernimpfstoffe werden als sicher und zuverlässig bezeichnet. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei zusätzlich auftretenden Veränderungen neutralisierender Epitope *Escape*-Viren entstehen, die durch den Impfstoff nicht mehr abgedeckt werden können. Bestehende Immunitätslücken in der Bevölkerung sollten zeitnah durch Impfung geschlossen werden, um dieses Risiko zu minimieren und einen dauerhaften Abbruch der MV-Zirkulation zu erreichen.

7. Zusammenfassung

Das Masernvirus (MV) gehört zur Familie der Paramyxoviridae und verursacht die Krankheit Masern, welche schwerwiegende Symptome hervorrufen kann. Seit vielen Jahren werden attenuierte Masernimpfviren vom Stamm Edmonston erfolgreich eingesetzt. Eine MV-Infektion bzw. Impfung induziert eine T- und B-Zell-Antwort, die einen lang anhaltenden Schutz vor einer Infektion mit verschiedenen Wildtyp-Virusvarianten vermittelt. Der Hauptanteil der durch die B-Zell-Antwort induzierten neutralisierenden Antikörper (Ak) erkennt das Oberflächenprotein Hämagglutinin (H). In dieser Arbeit wurden neutralisierende Epitope des H-Proteins von aktuellen Wildtyp-Viren im Vergleich zum Impfvirus analysiert. Das H-Protein besteht aus 617 Aminosäuren (AS). Zwischen dem H-Protein untersuchter Impf- und Wildtyp-Viren bestehen Unterschiede in der AS-Sequenz, die sich auch auf die Struktur neutralisierender Epitope auswirken können. Mit Hilfe der Hybridomatechnologie wurden sieben Impf-induzierte, H-spezifische, neutralisierende monoklonale Antikörper (mAk) hergestellt, um die neutralisierenden Epitope zu charakterisieren. Mit Hilfe eines *PepStarTM Peptide Microarrays* konnte für drei mAk das zugehörige Epitop auf der C-terminalen Rezeptor-Bindedomäne des H-Proteins lokalisiert werden: der mAk RKI-MV-1d bindet an das bereits beschriebene Epitop MV-H₂₄₄₋₂₅₀ (*neutralizing epitope*, NE), der mAk RKI-MV-33a an das ebenfalls bekannte Epitop MV-H₃₈₁₋₄₀₀ (*hemagglutinin noose epitope*, HNE) und der mAk RKI-MV-34c an das bekannte Epitop MV-H₃₀₉₋₃₁₅. Ein Vergleich der neutralisierenden Kapazität der erzeugten mAk gegenüber den Impfviren EdmZ und EdmS und den aktuell zirkulierenden Wildtyp-Viren zeigte, dass nur die mAk RKI-MV-12b und RKI-MV-34c jeweils ein konserviertes Epitop erkennen. Der mAk RKI-MV-1d konnte aufgrund der AS-Veränderung L249 zu P249 im NE nicht an die Virusisolate Duisburg.DEU/10.09 [D4] und Berlin.DEU/47.00 [D6] binden und keine Infektion verhindern. Die AS-Veränderung von K387 zu R387 im HNE verhinderte die Bindung des RKI-MV-33a an das H-Protein von Essen.DEU/12.10 [D8]. Der mAk RKI-MV-32c neutralisierte nur das Wildtyp-Virus Maryland.USA/0.54 vom Genotyp A und die von diesem Virus ausgehenden adaptierten und attenuierten Impfviren effektiv. Dieser mAk könnte für diagnostische Zwecke interessant sein. Die neutralisierende Kapazität der mAk RKI-MV-9c und RKI-MV-13a unterscheidet sich ebenfalls zwischen den untersuchten

Wildtyp-Virusvarianten. Diese Ergebnisse zeigen, dass von sieben hier identifizierten Epitopen zwei konservativ und fünf variabel sind. Jeder der fünf mAk, die ein variables Epitop erkennen, zeigte ein individuelles Neutralisationsmuster gegenüber den eingesetzten Wildtyp-Viren. Humane Impf-induzierte Seren neutralisierten die eingesetzten Wildtyp-Viren unabhängig von ihrem Epitopmuster. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine MV-Impfung neutralisierende Ak induziert, die vor einer Infektion mit verschiedenen Wildtyp-Virusvarianten schützt. Epidemiologische Erfahrungen zeigen, dass geimpfte Personen sehr selten erkranken. Neu auftretende Wildtyp-Viren mit zusätzlichen Epitopveränderungen im Vergleich zum Impfvirus können zu einer Verringerung der Impfeffizienz führen. Das Schließen von bestehenden Impflücken in der Population würde zu einem Abbruch der MV-Zirkulation führen und das Auftreten und die Zirkulation neuer Virusvarianten mit einem veränderten Epitopmuster verhindern.

8. Summary

The measles virus (MV) belongs to the family of paramyxoviruses and causes the disease measles, which can lead to severe complications. For many years attenuated measles vaccines derived from the Edmonston strain have been applied. A measles virus infection or vaccination induces a T- and B-cell response which facilitates long-lasting protection against an infection with different wild-type measles viruses. Most of the B-cell induced neutralizing antibodies recognize the measles surface protein hemagglutinin (H). In this PhD thesis neutralizing epitopes on the H protein of currently circulating measles wild-type viruses were analyzed in comparison to the vaccine virus. The H protein consists of 617 amino acids (aa). Between the vaccine and wild-type viruses investigated are differences in the aa sequence, which can also influence the structure of neutralizing epitopes. By applying the hybridomatechnology seven vaccine-induced, H-specific, neutralizing monoclonal antibodies were generated to analyze the neutralizing epitopes. The epitopes of three monoclonal antibodies were localized with the help of a peptide-microarray. The monoclonal antibody RKI-MV-1d recognized the known epitope MV-H₂₄₄₋₂₅₀ (*neutralizing epitope*, NE), RKI-MV-33a the also already known epitope MV-H₃₈₁₋₄₀₀ (*hemagglutinin noose epitope*, HNE) and RKI-MV-34c aa MV-H₃₀₉₋₃₁₅. A comparison of the neutralizing capacity of the monoclonal antibodies with the vaccine viruses EdmZ and EdmS as well as with the wild-type viruses shows that the monoclonal antibodies RKI-MV-12b and RKI-MV-34c recognized a conserved epitope. The monoclonal antibody RKI-MV-1d could not bind to the H protein and thus not neutralize isolates Duisburg.DEU/10.09 [D4] and Berlin.DEU/47.00 [D6], which was due to the aa exchange from L249 to P249. The aa exchange from K387 to R387 prevented the binding of the monoclonal antibody RKI-MV-33a to the H protein of the isolate Essen.DEU/12.10 [D8]. The monoclonal antibody RKI-MV-32c neutralized only the wild-type virus Maryland.USA/0.54 [A] and the adapted, attenuated vaccine viruses effectively. This monoclonal antibody could be useful for diagnostic purposes. The neutralizing capacity of the monoclonal antibodies RKI-MV-9c and RKI-MV-13a differs between the investigated wild-type viruses as well. Human vaccine-induced sera neutralized the investigated wild-type viruses independently of the epitope pattern. This result indicates that the MV-vaccination

induces neutralizing antibodies which prevent an infection with different wild-type viruses. Epidemiological data show that vaccinated people become rarely infected. Newly occurring wild-type viruses with additional changes in the epitopes compared with the epitopes of the vaccine might decrease the efficacy of vaccination. Closing existing vaccination gaps in a population could stop the measles virus circulation and avoid the occurrence and the circulation of new virus variants with a modified epitope pattern.

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADME	Autoimmunenzephalitis
AI	Aviditätsindex
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
b	Base
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
c	Zenti
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD46	<i>Membrane cofactor protein</i>
CD150	<i>Signalling lymphocyte-activation molecule</i>
CHO	Chinesische Hamster Ovarienzelllinie
cLSM	Konfokales Laser Raster Mikroskop
CMC	Carboxymethylcellulose Natriumsalz
CPE	Zytopathischer Effekt
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
ddNTP	2', 3'-Didesoxynukleosidtriphosphate
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	Dithiothreitol
ECDC	<i>European Center of Disease Prevention and Control</i>
Edm	Edmonston
EdmZ	Edmonston-Zagreb
EdmS	Edmonston-Schwarz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
F	Fusionsprotein

FKS	Fötale Kälberserum
FRNT	<i>Focus of infection reduction neutralization test</i>
g	Gramm
h	Stunde
H	Hämagglutininprotein
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT)
HNE	<i>Hemagglutinin noose epitope</i>
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IL-6	Interleukin-6
IP	Immunpräzipitation
i.p.	intraperitoneal
k	Kilo
l	Liter
L	Largeprotein
m	Meter
m	Milli
m	Monoklonal
M	Matrixprotein
M	Molar
min	Minute
mol	Mol
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisation
MCP	<i>Membrane cofactor protein</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MIBE	Akute Einschlußkörperchenenzephalitis
MMR	Masern, Mumps, Röteln
MMRV	Masern, Mumps, Röteln, Varizellen
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	messenger RNA
MV	Masernviren
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
n	Nano
N	Nukleokapsidprotein
NE	<i>Neutralizing epitope</i>
NRZ MMR	Nationalen Referenzzentrum Masern, Mumps, Röteln
OD	Optische Dichte

OPp	prozentuale OD
P	Phosphoprotein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylen Glykol
PEI	Polyethylenimine
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>Plaque forming units</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVF	<i>Primary vaccine failure</i>
PVRL4	<i>Polio receptor like gene</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SCR	<i>Short consensus repeats</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese
S-FRNT	<i>Screening-Focus of infection reduction neutralization test</i>
SLAM	<i>Signalling lymphocyte-activation molecule</i>
SSPE	Subakute Sklerosierende Panenzephalitis
STIKO	Ständige Impfkommision
SVF	<i>Secondary vaccine failure</i>
Ta	<i>Annealing</i> Temperatur
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TOF	Flugzeitmassenanalysator
U	Unit
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
μ	Micro
z. B.	zum Beispiel

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Klinische Symptome einer Masernerkrankung.	7
Abb. 2: Neuronale Erkrankungen nach einer MV-Infektion.	8
Abb. 3: Taxonomische Einordnung des Masernvirus.	9
Abb. 4: Aufbau und Genomstruktur des MV.	11
Abb. 5: Aufbau des Oberflächenproteins Hämagglutinin (H).	13
Abb. 6: Konformationsänderungen des H-Proteins nach Rezeptorbindung.	13
Abb. 7: Aufbau des Zellrezeptors CD46.	14
Abb. 8: Aufbau des Zellrezeptors SLAM und Interaktion mit dem H-Protein.	15
Abb. 9: Aufbau des Zellrezeptors Nectin-4.	16
Abb. 10: Aufbau eines IgG-Moleküls.	18
Abb. 11: Adaption des Edmonston Virus an verschiedene Zelllinien.	21
Abb. 12: Masern Impfraten und Anzahl der Masernerkrankungen in der europäischen Region.	22
Abb. 13: Anzahl der AS-Austausche im H-Protein von aktuellen Wildtyp-Viren gegenüber dem Impfvirus EdmZ.	62
Abb. 14: Vergleich der AS-Sequenzen des H-Proteins der untersuchten MV-Isolate.	63
Abb. 15: Titration des inaktivierten und nativen EdmZ auf Vero-Zellen.	65
Abb. 16: Nachweis viraler Strukturproteine in inaktivierter Virussuspension.	66
Abb. 17: Nachweis MV-neutralisierender Ak im Mausserum.	67
Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse zur Ak-Produktion in Hybridomzellen.	69
Abb. 19: Reinheit der erzeugten mAk in der SDS-PAGE.	70
Abb. 20: Peptidfragmentmuster der mAk nach massenspektrometrischer Analyse.	71
Abb. 21: Bindung der mAk an das H-Protein des MV EdmZ.	73
Abb. 22: Bindung der mAk an rekombinantes H-Protein in einem IFT.	74
Abb. 23: Titration der mAk auf einer MV-Mikrotiterplatte.	75
Abb. 24: Bestimmung der Avidität der mAk gegenüber MV in einem Aviditäts-ELISA.	76
Abb. 25: Bindung der mAk an das H-Protein im Western Blot.	77
Abb. 26: Bindung des mAk RKI-MV-1d an NE-Peptide.	78
Abb. 27: Bindung des mAk RKI-MV-33a an HNE-Peptide.	79
Abb. 28: Bindung des mAk RKI-MV-34c an überlappende Peptide des H-Proteins.	80
Abb. 29: Neutralisierende Kapazität humaner Impf-induzierter Seren gegenüber MV.	84
Abb. 30: Bindung des mAk RKI-MV-1d an rekombinantes H-Protein des EdmZ und Duisburg.DEU/10.09.	86

Abb. 31: Bindung des mAk RKI-MV-1d an rekombinantes H-Protein des EdmZ und Berlin.DEU/47.00.	87
Abb. 32: Bindung des mAk RKI-MV-33a an das rekombinante H-Protein des EdmZ, Berlin.DEU/10.10 und Essen.DEU/12.10.	89
Abb. 33: Bindung des mAk RKI-MV-34c an rekombinantes H-Protein des EdmZ.	91
Abb. 34: Modell des H-Proteins mit Bindungsstellen für neutralisierende mAk und Zellrezeptoren.	96
Abb. 35: Epitop des mAk RKI-MV-34c auf dem H-Protein.	98
Abb. 36: Epitop des mAk RKI-MV-33a auf dem H-Protein.	100
Abb. 37: Model des amphiphilen HNE.	100
Abb. 38: Epitop des mAk RKI-MV-1d auf dem H-Protein.	102
Abb. 39: Strukturmodell des NE.	103

11. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Aminosäuren, ihre Abkürzung und Eigenschaft der Seitenkette.	20
Tab. 2: Neutralisierende mAk und ihr Bindungsbereich am H-Protein.	20
Tab. 3: Immunisierung, Blutabnahme und Tötung der Versuchstiere.	42
Tab. 4: Verdünnungsstufen zur Subklonierung von Hybridomzellen.	45
Tab. 5: Zusammensetzung eines SDS-Gels.	48
Tab. 6: Zusätzliche Peptide auf dem <i>Peptide Microarray</i> .	50
Tab. 7: 1. Reaktionsansatz zur Herstellung von cDNA.	54
Tab. 8: 2. Reaktionsansatz zur Herstellung von cDNA.	54
Tab. 9: Reaktionsansatz für eine PCR.	55
Tab. 10: Reaktionsansatz für eine Sequenzierungs-PCR.	56
Tab. 11: Sequenzierungsprimer und ihre <i>Annealing</i> -Temperatur (Ta).	56
Tab. 12: <i>Thermocycler</i> -Protokoll für eine Sequenzierungs-PCR.	56
Tab. 13: <i>Thermocycler</i> -Protokoll für eine PCR zur Amplifikation des H-Gens.	57
Tab. 14: <i>Thermocycler</i> -Protokoll für eine PCR mit Klonierungsprimern.	57
Tab. 15: Reaktionsansatz für einen Enzymverdau von Vektor und PCR-Amplifikaten.	58
Tab. 16: Reaktionsansatz für eine Ligation.	58
Tab. 17: Hergestellte Plasmide mit dem H-Gen als <i>Insert</i> .	59
Tab. 18: Reaktionsansatz einer PCR zur Mutagenese.	59
Tab. 19: <i>Thermocycler</i> -Protokoll einer PCR mit Mutagenese-Primern.	59
Tab. 20: Hergestellte Plasmide mit Mutationen im H-Gen.	60
Tab. 21: Sequenzdaten des H-Gens ausgewählter MV-Isolate.	61
Tab. 22: Potentielle Glykosylierungsstellen des H-Proteins untersuchter MV.	64
Tab. 23: Erzeugte MV-neutralisierende mAk aus Maus 1 und Maus 2.	70
Tab. 24: Isotyp der erzeugten mAk.	72
Tab. 25: Sättigungskonzentration der mAk auf einer MV-Mikrotiterplatte.	75
Tab. 26: Neutralisierende Kapazität der mAk auf Zellen mit verschiedenen Rezeptoren.	81
Tab. 27: Neutralisierende Kapazität der mAk gegenüber Impf- und Wildtyp-Viren.	82
Tab. 28: Neutralisierende Kapazität der mAk BH216 und BH47 gegenüber MV.	83
Tab. 29: Vergleich der AS-Sequenzen des NE untersuchter MV.	85
Tab. 30: NE-Sequenz der erzeugten Plasmide zur Expression des H-Proteins.	85
Tab. 31: Vergleich der AS-Sequenz des HNE untersuchter MV.	88
Tab. 32: HNE-Sequenz der erzeugten Plasmide zur Expression des H-Proteins.	88
Tab. 33: Vergleich der mit RKI-MV-34c interagierenden AS-Sequenz eingesetzter MV.	90
Tab. 34: AS-Sequenz des Epitops von RKI-MV-34c in Expressionsplasmiden.	91

Tab. 35: AS-Variationen des H-Proteins von Sofia.BGR/19.05 [H1] im Vergleich zum H-Protein der durch mAk RKI-MV-13a neutralisierten MV.

92

12. Literaturverzeichnis

1. 2011. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG), Bundesgesetzblatt BGBl.
2. 2010. Renewed commitment to measles and rubella elimination and prevention of congenital rubella syndrome in the WHO European Region by 2015, Regional Committee for Europe, Sixtieth session, vol. EUR/RC60/15.
3. Alberts, B. B., Dennis; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Watson, James D (ed.). 1994. *Molecular Biology Of The Cell* vol. 3. Taylor & Francis.
4. Albrecht, P., F. A. Ennis, E. J. Saltzman, and S. Krugman. 1977. Persistence of maternal antibody in infants beyond 12 months: mechanism of measles vaccine failure. *The Journal of pediatrics* 91:715-718.
5. Alkhatib, G., and D. J. Briedis. 1986. The predicted primary structure of the measles virus hemagglutinin. *Virology* 150:479-490.
6. Anders, J. F., R. M. Jacobson, G. A. Poland, S. J. Jacobsen, and P. C. Wollan. 1996. Secondary failure rates of measles vaccines: a metaanalysis of published studies. *The Pediatric infectious disease journal* 15:62-66.
7. Andres, O., K. Obojes, K. S. Kim, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies. 2003. CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *The Journal of general virology* 84:1189-1197.
8. Bankamp, B., S. M. Horikami, P. D. Thompson, M. Huber, M. Billeter, and S. A. Moyer. 1996. Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly. *Virology* 216:272-277.
9. Bartz, R., R. Firsching, B. Rima, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies. 1998. Differential receptor usage by measles virus strains. *The Journal of general virology* 79 (Pt 5):1015-1025.
10. Bleharski, J. R., K. R. Niazi, P. A. Sieling, G. Cheng, and R. L. Modlin. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *Journal of immunology* 167:3174-3181.
11. Blumberg, B. M., J. C. Crowley, J. I. Silverman, J. Menonna, S. D. Cook, and P. C. Dowling. 1988. Measles virus L protein evidences elements of ancestral RNA polymerase. *Virology* 164:487-497.
12. Bolt, G., I. R. Pedersen, and M. Blixenkron-Moller. 1999. Processing of N-linked oligosaccharides on the measles virus glycoproteins: importance for antigenicity and for production of infectious virus particles. *Virus research* 61:43-51.

13. Bouche, F. B., O. T. Ertl, and C. P. Muller. 2002. Neutralizing B cell response in measles. *Viral immunology* 15:451-471.
14. Brancati, F., P. Fortugno, I. Bottillo, M. Lopez, E. Josselin, O. Boudghene-Stambouli, E. Agolini, L. Bernardini, E. Bellacchio, M. Iannicelli, A. Rossi, A. Dib-Lachachi, L. Stuppia, G. Palka, S. Mundlos, S. Stricker, U. Kornak, G. Zambruno, and B. Dallapiccola. 2010. Mutations in PVRL4, encoding cell adhesion molecule nectin-4, cause ectodermal dysplasia-syndactyly syndrome. *American journal of human genetics* 87:265-273.
15. Brugha, R., M. Ramsay, T. Forsey, and D. Brown. 1996. A study of maternally derived measles antibody in infants born to naturally infected and vaccinated women. *Epidemiology and infection* 117:519-524.
16. Buchholz, C. J., D. Koller, P. Devaux, C. Mumenthaler, J. Schneider-Schaulies, W. Braun, D. Gerlier, and R. Cattaneo. 1997. Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46. *The Journal of biological chemistry* 272:22072-22079.
17. Caignard, G., M. Guerbois, J. L. Labernardiere, Y. Jacob, L. M. Jones, F. Wild, F. Tangy, and P. O. Vidalain. 2007. Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. *Virology* 368:351-362.
18. Cocks, B. G., C. C. Chang, J. M. Carballido, H. Yssel, J. E. de Vries, and G. Aversa. 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376:260-263.
19. Colf, L. A., Z. S. Juo, and K. C. Garcia. 2007. Structure of the measles virus hemagglutinin. *Nature structural & molecular biology* 14:1227-1228.
20. Damien, B., S. Huiss, F. Schneider, and C. P. Muller. 1998. Estimated susceptibility to asymptomatic secondary immune response against measles in late convalescent and vaccinated persons. *Journal of medical virology* 56:85-90.
21. Dandliker, W. B., R. Alonso, V. A. de Saussure, F. Kierszenbaum, S. A. Levison, and H. C. Schapiro. 1967. The effect of chaotropic ions on the dissociation of antigen-antibody complexes. *Biochemistry* 6:1460-1467.
22. de Swart, R. L., S. Yuksel, and A. D. Osterhaus. 2005. Relative contributions of measles virus hemagglutinin- and fusion protein-specific serum antibodies to virus neutralization. *Journal of virology* 79:11547-11551.
23. Deroo, S., K. C. El Kasmi, P. Fournier, D. Theisen, N. H. Brons, M. Herrmann, J. Desmet, and C. P. Muller. 1998. Enhanced antigenicity of a four-contact-residue epitope of the measles virus hemagglutinin protein by phage display libraries: evidence of a helical structure in the putative active site. *Molecular immunology* 35:435-443.

24. Dhiman, N., R. M. Jacobson, and G. A. Poland. 2004. Measles virus receptors: SLAM and CD46. *Reviews in medical virology* 14:217-229.
25. Dorig, R. E., A. Marcil, A. Chopra, and C. D. Richardson. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75:295-305.
26. Dowdle, W. R. 1998. The principles of disease elimination and eradication. *Bulletin of the World Health Organization* 76 Suppl 2:22-25.
27. Drake, J. W. 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:4171-4175.
28. Drysdale, H. C., L. F. Jones, D. R. Oppenheimer, and A. H. Tomlinson. 1976. Measles inclusion-body encephalitis in a child with treated acute lymphoblastic leukaemia. *Journal of clinical pathology* 29:865-872.
29. Duke, T., and C. S. Mgone. 2003. Measles: not just another viral exanthem. *Lancet* 361:763-773.
30. ECDC. 2012. Surveillance report, 21 February 2012. European monthly measles monitoring (EMMO).
31. El Kasmi, K. C., D. Theisen, N. H. Brons, and C. P. Muller. 1998. The molecular basis of virus crossreactivity and neutralisation after immunisation with optimised chimeric peptides mimicking a putative helical epitope of the measles virus hemagglutinin protein. *Molecular immunology* 35:905-918.
32. Enders, J. F., and T. C. Peebles. 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 86:277-286.
33. Erlenhofer, C., W. J. Wurzer, S. Löffler, S. Schneider-Schaulies, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies. 2001. CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *Journal of virology* 75:4499-4505.
34. Erlenhofer, C., W. P. Duprex, B. K. Rima, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies. 2002. Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *The Journal of general virology* 83:1431-1436.
35. Escoffier, C., S. Manie, S. Vincent, C. P. Muller, M. Billeter, and D. Gerlier. 1999. Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *Journal of virology* 73:1695-1698.
36. Esolen, L. M., K. Takahashi, R. T. Johnson, A. Vaisberg, T. R. Moench, S. L. Wesselingh, and D. E. Griffin. 1995. Brain endothelial cell infection in children with acute fatal measles. *The Journal of clinical investigation* 96:2478-2481.

37. Esolen, L. M., B. J. Ward, T. R. Moench, and D. E. Griffin. 1993. Infection of monocytes during measles. *The Journal of infectious diseases* 168:47-52.
38. Fazekas de St, G., and R. G. Webster. 1966. Disquisitions of Original Antigenic Sin. I. Evidence in man. *The Journal of experimental medicine* 124:331-345.
39. Finsterbusch, T., A. Wolbert, I. Deitemeier, K. Meyer, M. M. Mosquera, A. Mankertz, and S. Santibanez. 2009. Measles viruses of genotype H1 evade recognition by vaccine-induced neutralizing antibodies targeting the linear haemagglutinin noose epitope. *The Journal of general virology* 90:2739-2745.
40. Fournier, P., N. H. Brons, G. A. Berbers, K. H. Wiesmuller, B. T. Fleckenstein, F. Schneider, G. Jung, and C. P. Muller. 1997. Antibodies to a new linear site at the topographical or functional interface between the haemagglutinin and fusion proteins protect against measles encephalitis. *The Journal of general virology* 78 (Pt 6):1295-1302.
41. Giladi, M., A. Schulman, R. Kedem, and Y. L. Danon. 1987. Measles in adults: a prospective study of 291 consecutive cases. *Br Med J (Clin Res Ed)* 295:1314.
42. Giraudon, P., and T. F. Wild. 1985. Correlation between epitopes on hemagglutinin of measles virus and biological activities: passive protection by monoclonal antibodies is related to their hemagglutination inhibiting activity. *Virology* 144:46-58.
43. Goding, J. W. 1980. Antibody production by hybridomas. *Journal of immunological methods* 39:285-308.
44. Goncalves, G., F. T. Cutts, M. Hills, H. Rebelo-Andrade, F. A. Trigo, and H. Barros. 1999. Transplacental transfer of measles and total IgG. *Epidemiology and infection* 122:273-279.
45. Hamalainen, H., S. Meissner, and R. Lahesmaa. 2000. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells. *Journal of immunological methods* 242:9-19.
46. Hashiguchi, T., M. Kajikawa, N. Maita, M. Takeda, K. Kuroki, K. Sasaki, D. Kohda, Y. Yanagi, and K. Maenaka. 2007. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:19535-19540.
47. Hashiguchi, T., K. Maenaka, and Y. Yanagi. 2011. Measles virus hemagglutinin: structural insights into cell entry and measles vaccine. *Frontiers in microbiology* 2:247.
48. Hashiguchi, T., T. Ose, M. Kubota, N. Maita, J. Kamishikiryo, K. Maenaka, and Y. Yanagi. 2011. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. *Nature structural & molecular biology* 18:135-141.
49. Hashimoto, K., N. Ono, H. Tatsuo, H. Minagawa, M. Takeda, K. Takeuchi, and Y. Yanagi. 2002. SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by

- recombinant virus expressing green fluorescent protein. *Journal of virology* 76:6743-6749.
50. Hickman, C. J., T. B. Hyde, S. B. Sowers, S. Mercader, M. McGrew, N. J. Williams, J. A. Beeler, S. Audet, B. Kiehl, R. Nandy, A. Tamin, and W. J. Bellini. 2011. Laboratory characterization of measles virus infection in previously vaccinated and unvaccinated individuals. *The Journal of infectious diseases* 204 Suppl 1:S549-558.
 51. Horikami, S. M., S. Smallwood, B. Bankamp, and S. A. Moyer. 1994. An amino-proximal domain of the L protein binds to the P protein in the measles virus RNA polymerase complex. *Virology* 205:540-545.
 52. Hosoya, M. 2006. Measles encephalitis: direct viral invasion or autoimmune-mediated inflammation? *Internal medicine* 45:841-842.
 53. Hourcade, D., V. M. Holers, and J. P. Atkinson. 1989. The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Advances in immunology* 45:381-416.
 54. Hu, A., R. Cattaneo, S. Schwartz, and E. Norrby. 1994. Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein. *The Journal of general virology* 75 (Pt 5):1043-1052.
 55. Hu, A., H. Sheshberadaran, E. Norrby, and J. Kovamees. 1993. Molecular characterization of epitopes on the measles virus hemagglutinin protein. *Virology* 192:351-354.
 56. Hummel, K. B., and W. J. Bellini. 1995. Localization of monoclonal antibody epitopes and functional domains in the hemagglutinin protein of measles virus. *Journal of virology* 69:1913-1916.
 57. Iwasaki, M., M. Takeda, Y. Shirogane, Y. Nakatsu, T. Nakamura, and Y. Yanagi. 2009. The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *Journal of virology* 83:10374-10383.
 58. Jiang, M., Y. Zhao, F. Shen, F. Wang, Y. He, and C. Ruan. 2011. Epitope mapping of human VWF A3 recognized by monoclonal antibody SZ-123 and SZ-125 using MALDI mass spectrometry. *International journal of hematology* 94:241-247.
 59. Kearney, J. F., A. Radbruch, B. Liesegang, and K. Rajewsky. 1979. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *Journal of immunology* 123:1548-1550.
 60. Kilic, A., S. Altinkaynak, V. Ertekin, and T. Inandi. 2003. The duration of maternal measles antibodies in children. *Journal of tropical pediatrics* 49:302-305.
 61. King, A. L., E; Adams, MJ; Carstens, EB (ed.). 2011. *Virus Taxonomy* vol. Ninth Report Elsevier Academic Press.

62. Klingele, M., H. K. Hartter, F. Adu, W. Ammerlaan, W. Ikusika, and C. P. Muller. 2000. Resistance of recent measles virus wild-type isolates to antibody-mediated neutralization by vaccinees with antibody. *Journal of medical virology* 62:91-98.
63. Knipe, D. H., PM; Griffin, DE; Lamp, RA; Martin, MA; Roizman, B; Straus, SE (ed.). 2007. *Fields Virology*, 5. ed, vol. 1-2. Lippincott Williams & Wilkins; Wolters Kluwer Health.
64. Komune, N., T. Ichinohe, M. Ito, and Y. Yanagi. 2011. Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion. *Journal of virology*.
65. Krantic, S., C. Gimenez, and C. Rabourdin-Combe. 1995. Cell-to-cell contact via measles virus haemagglutinin-CD46 interaction triggers CD46 downregulation. *The Journal of general virology* 76 (Pt 11):2793-2800.
66. Langedijk, J. P., F. J. Daus, and J. T. van Oirschot. 1997. Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin. *Journal of virology* 71:6155-6167.
67. Li, L., and Y. Qi. 2002. A novel amino acid position in hemagglutinin glycoprotein of measles virus is responsible for hemadsorption and CD46 binding. *Archives of virology* 147:775-786.
68. Liebert, U. G., S. G. Flanagan, S. Loffler, K. Baczko, V. ter Meulen, and B. K. Rima. 1994. Antigenic determinants of measles virus hemagglutinin associated with neurovirulence. *Journal of virology* 68:1486-1493.
69. Liston, P., C. DiFlumeri, and D. J. Briedis. 1995. Protein interactions entered into by the measles virus P, V, and C proteins. *Virus research* 38:241-259.
70. Liszewski, M. K., T. W. Post, and J. P. Atkinson. 1991. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annual review of immunology* 9:431-455.
71. Maisner, A., J. Schneider-Schaulies, M. K. Liszewski, J. P. Atkinson, and G. Herrler. 1994. Binding of measles virus to membrane cofactor protein (CD46): importance of disulfide bonds and N-glycans for the receptor function. *Journal of virology* 68:6299-6304.
72. Makela, M. J., G. A. Lund, and A. A. Salmi. 1989. Antigenicity of the measles virus haemagglutinin studied by using synthetic peptides. *The Journal of general virology* 70 (Pt 3):603-614.
73. Makela, M. J., A. A. Salmi, E. Norrby, and T. F. Wild. 1989. Monoclonal antibodies against measles virus haemagglutinin react with synthetic peptides. *Scandinavian journal of immunology* 30:225-231.

74. Malvoisin, E., and F. Wild. 1990. Contribution of measles virus fusion protein in protective immunity: anti-F monoclonal antibodies neutralize virus infectivity and protect mice against challenge. *Journal of virology* 64:5160-5162.
75. Malvoisin, E., and T. F. Wild. 1993. Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins. *The Journal of general virology* 74 (Pt 11):2365-2372.
76. Manchester, M., and G. F. Rall. 2001. Model Systems: transgenic mouse models for measles pathogenesis. *Trends in microbiology* 9:19-23.
77. Mankertz, A., Z. Mihneva, H. Gold, S. Baumgarte, A. Baillot, R. Helble, H. Roggendorf, G. Bosevska, J. Nedeljkovic, A. Makowka, V. Hutse, H. Holzmann, S. W. Aberle, S. Cordey, G. Necula, A. Mentis, G. Korukluoglu, M. Carr, K. E. Brown, J. M. Hubschen, C. P. Muller, M. N. Mulders, and S. Santibanez. 2011. Spread of measles virus D4-Hamburg, Europe, 2008-2011. *Emerging infectious diseases* 17:1396-1401.
78. Masse, N., M. Ainouze, B. Neel, T. F. Wild, R. Buckland, and J. P. Langedijk. 2004. Measles virus (MV) hemagglutinin: evidence that attachment sites for MV receptors SLAM and CD46 overlap on the globular head. *Journal of virology* 78:9051-9063.
79. McNearney, T., L. Ballard, T. Seya, and J. P. Atkinson. 1989. Membrane cofactor protein of complement is present on human fibroblast, epithelial, and endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 84:538-545.
80. Mikhalap, S. V., L. M. Shlapatska, O. V. Yurchenko, M. Y. Yurchenko, G. G. Berdova, K. E. Nichols, E. A. Clark, and S. P. Sidorenko. 2004. The adaptor protein SH2D1A regulates signaling through CD150 (SLAM) in B cells. *Blood* 104:4063-4070.
81. Minagawa, H., K. Tanaka, N. Ono, H. Tatsuo, and Y. Yanagi. 2001. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *The Journal of general virology* 82:2913-2917.
82. Modlin, J. F., J. T. Jabbour, J. J. Witte, and N. A. Halsey. 1977. Epidemiologic studies of measles, measles vaccine, and subacute sclerosing panencephalitis. *Pediatrics* 59:505-512.
83. Modrow, S. F., D; Truyen, U; Schätzl, H (ed.). 2010. *Molekulare Virologie*, vol. 3. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010.
84. Moulin, E., V. Beal, D. Jeantet, B. Horvat, T. F. Wild, and D. Waku-Kouomou. 2011. Molecular characterization of measles virus strains causing subacute sclerosing panencephalitis in France in 1977 and 2007. *Journal of medical virology* 83:1614-1623.
85. Muhlebach, M. D., M. Mateo, P. L. Sinn, S. Pruffer, K. M. Uhlig, V. H. Leonard, C. K. Navaratnarajah, M. Frenzke, X. X. Wong, B. Sawatsky, S. Ramachandran, P. B.

- McCray, K. Cichutek, V. von Messling, M. Lopez, and R. Cattaneo. 2011. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature*.
86. Muhlebach, M. D., M. Mateo, P. L. Sinn, S. Pruffer, K. M. Uhlig, V. H. Leonard, C. K. Navaratnarajah, M. Frenzeke, X. X. Wong, B. Sawatsky, S. Ramachandran, P. B. McCray, Jr., K. Cichutek, V. von Messling, M. Lopez, and R. Cattaneo. 2011. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 480:530-533.
87. Murphy, K. M., P. Traveers, and M. Walport (ed.). 2009. *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer.
88. Nakanishi, H., and Y. Takai. 2004. Roles of nectins in cell adhesion, migration and polarization. *Biological chemistry* 385:885-892.
89. Nanche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Roubourdin-Combe, and D. Gerlier. 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *Journal of virology* 67:6025-6032.
90. Nanche, D., T. F. Wild, C. Roubourdin-Combe, and D. Gerlier. 1992. A monoclonal antibody recognizes a human cell surface glycoprotein involved in measles virus binding. *The Journal of general virology* 73 (Pt 10):2617-2624.
91. Navaratnarajah, C. K., N. Oezguen, L. Rupp, L. Kay, V. H. Leonard, W. Braun, and R. Cattaneo. 2011. The heads of the measles virus attachment protein move to transmit the fusion-triggering signal. *Nature structural & molecular biology* 18:128-134.
92. Nicoara, C., K. Zach, D. Trachsel, D. Germann, and L. Matter. 1999. Decay of passively acquired maternal antibodies against measles, mumps, and rubella viruses. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 6:868-871.
93. Noyce, R. S., D. G. Bondre, M. N. Ha, L. T. Lin, G. Sisson, M. S. Tsao, and C. D. Richardson. 2011. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS pathogens* 7:e1002240.
94. Ono, N., H. Tatsuo, K. Tanaka, H. Minagawa, and Y. Yanagi. 2001. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *Journal of virology* 75:1594-1600.
95. Parker, C. E., and K. B. Tomer. 2000. Epitope mapping by a combination of epitope excision and MALDI-MS. *Methods in molecular biology* 146:185-201.
96. Pfaff, G., B. Mezger, S. Santibanez, U. Hoffmann, S. Maassen, U. Wagner, and A. Siedler. 2008. Measles in south-west Germany imported from Switzerland--a preliminary outbreak description. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 13.

97. Plemper, R. K., A. L. Hammond, and R. Cattaneo. 2000. Characterization of a region of the measles virus hemagglutinin sufficient for its dimerization. *Journal of virology* 74:6485-6493.
98. Poethko-Muller, C., and A. Mankertz. 2011. Sero-epidemiology of measles-specific IgG antibodies and predictive factors for low or missing titres in a German population-based cross-sectional study in children and adolescents (KiGGS). *Vaccine* 29:7949-7959.
99. Polack, F. P., S. H. Lee, S. Permar, E. Manyara, H. G. Nousari, Y. Jeng, F. Mustafa, A. Valsamakis, R. J. Adams, H. L. Robinson, and D. E. Griffin. 2000. Successful DNA immunization against measles: neutralizing antibody against either the hemagglutinin or fusion glycoprotein protects rhesus macaques without evidence of atypical measles. *Nature medicine* 6:776-781.
100. Pullen, G. R., M. G. Fitzgerald, and C. S. Hosking. 1986. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *Journal of immunological methods* 86:83-87.
101. Putz, M. M., W. Ammerlaan, F. Schneider, G. Jung, and C. P. Muller. 2004. Humoral immune responses to a protective peptide-conjugate against measles after different prime-boost regimens. *Vaccine* 22:4173-4182.
102. Putz, M. M., J. Hoebeke, W. Ammerlaan, S. Schneider, and C. P. Muller. 2003. Functional fine-mapping and molecular modeling of a conserved loop epitope of the measles virus hemagglutinin protein. *European journal of biochemistry / FEBS* 270:1515-1527.
103. Ray, J., and R. S. Fujinami. 1987. Characterization of in vitro transcription and transcriptional products of measles virus. *Journal of virology* 61:3381-3387.
104. Reymond, N., S. Fabre, E. Lecocq, J. Adelaide, P. Dubreuil, and M. Lopez. 2001. Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. *The Journal of biological chemistry* 276:43205-43215.
105. Richard, J. L., and V. Masserey Spicher. 2009. Large measles epidemic in Switzerland from 2006 to 2009: consequences for the elimination of measles in Europe. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 14.
106. Riddell, M. A., W. J. Moss, D. Hauer, M. Monze, and D. E. Griffin. 2007. Slow clearance of measles virus RNA after acute infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 39:312-317.
107. Riley-Vargas, R. C., D. B. Gill, C. Kemper, M. K. Liszewski, and J. P. Atkinson. 2004. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends in immunology* 25:496-503.

108. RKI. 2011. Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 30:20.
109. RKI. 2012. Impfquoten bei der Schuleingangsuntersuchung in Deutschland 2010. *Epidemiologisches Bulletin* 16.
110. RKI. 2007. Masern: Erreichen der Elimination in Deutschland gefährdet! Bericht zu Molekularepidemiologie und Meldedaten von 1999 bis 2007. *Epidemiologisches Bulletin* 37.
111. Romagnani, S. 1991. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *International journal of clinical & laboratory research* 21:152-158.
112. Rota, J., L. Lowe, P. Rota, W. Bellini, S. Redd, G. Dayan, R. van Binnendijk, S. Hahne, G. Tipples, J. Macey, R. Espinoza, D. Posey, A. Plummer, J. Bateman, J. Gudino, E. Cruz-Ramirez, I. Lopez-Martinez, L. Anaya-Lopez, T. Holy Akwar, S. Giffin, V. Carrion, A. M. de Filippis, A. Vicari, C. Tan, B. Wolf, K. Wytovich, P. Borus, F. Mbugua, P. Chege, J. Kombich, C. Akoua-Koffi, S. Smit, H. Bukenya, J. Bwogi, F. N. Baliraine, J. Kremer, C. Muller, and S. Santibanez. 2006. Identical genotype B3 sequences from measles patients in 4 countries, 2005. *Emerging infectious diseases* 12:1779-1781.
113. Rota, J. S., K. B. Hummel, P. A. Rota, and W. J. Bellini. 1992. Genetic variability of the glycoprotein genes of current wild-type measles isolates. *Virology* 188:135-142.
114. Rota, J. S., Z. D. Wang, P. A. Rota, and W. J. Bellini. 1994. Comparison of sequences of the H, F, and N coding genes of measles virus vaccine strains. *Virus research* 31:317-330.
115. Rota, P. A., K. Brown, A. Mankertz, S. Santibanez, S. Shulga, C. P. Muller, J. M. Hubschen, M. Siqueira, J. Beirnes, H. Ahmed, H. Triki, S. Al-Busaidy, A. Dosseh, C. Byabamazima, S. Smit, C. Akoua-Koffi, J. Bwogi, H. Bukenya, N. Wairagkar, N. Ramamurty, P. Incomserb, S. Pattamadilok, Y. Jee, W. Lim, W. Xu, K. Komase, M. Takeda, T. Tran, C. Castillo-Solorzano, P. Chenoweth, D. Brown, M. N. Mulders, W. J. Bellini, and D. Featherstone. 2011. Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology. *The Journal of infectious diseases* 204 Suppl 1:S514-523.
116. Runkler, N., C. Pohl, S. Schneider-Schaulies, H. D. Klenk, and A. Maisner. 2007. Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cellular microbiology* 9:1203-1214.
117. Santibanez, S., S. Niewiesk, A. Heider, J. Schneider-Schaulies, G. A. Berbers, A. Zimmermann, A. Halenius, A. Wolbert, I. Deitemeier, A. Tischer, and H. Hengel. 2005.

- Probing neutralizing-antibody responses against emerging measles viruses (MVs): immune selection of MV by H protein-specific antibodies? *The Journal of general virology* 86:365-374.
118. Saphire, E. O., and M. B. Oldstone. 2011. Measles virus fusion shifts into gear. *Nature structural & molecular biology* 18:115-116.
 119. Sato, H., M. Masuda, M. Kanai, K. Tsukiyama-Kohara, M. Yoneda, and C. Kai. 2007. Measles virus N protein inhibits host translation by binding to eIF3-p40. *Journal of virology* 81:11569-11576.
 120. Sato, T. A., M. Enami, and T. Kohama. 1995. Isolation of the measles virus hemagglutinin protein in a soluble form by protease digestion. *Journal of virology* 69:513-516.
 121. Sato, T. A., T. Kohama, and A. Sugiura. 1988. Intracellular processing of measles virus fusion protein. *Archives of virology* 98:39-50.
 122. Sato, T. A., T. Kohama, and A. Sugiura. 1989. Protective role of human antibody to the fusion protein of measles virus. *Microbiology and immunology* 33:601-607.
 123. Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M. G. Roncarolo, H. Oettgen, J. E. De Vries, G. Aversa, and C. Terhorst. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395:462-469.
 124. Schmid, D., H. Holzmann, K. Schwarz, S. Kasper, H. W. Kuo, S. W. Aberle, M. Redlberger-Fritz, W. Hautmann, S. Santibanez, A. Mankertz, C. Konig, E. Magnet, S. Reichart, S. Meusburger, A. Luckner-Hornischer, A. De Martin, E. Bechter, J. Stirling, and F. Allerberger. 2010. Measles outbreak linked to a minority group in Austria, 2008. *Epidemiology and infection* 138:415-425.
 125. Schneider-Schaulies, J., L. M. Dunster, F. Kobune, B. Rima, and V. ter Meulen. 1995. Differential downregulation of CD46 by measles virus strains. *Journal of virology* 69:7257-7259.
 126. Schrag, S. J., P. A. Rota, and W. J. Bellini. 1999. Spontaneous mutation rate of measles virus: direct estimation based on mutations conferring monoclonal antibody resistance. *Journal of virology* 73:51-54.
 127. Seifried, A. S., P. Albrecht, and J. B. Milstien. 1978. Characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity associated with measles virus. *Journal of virology* 25:781-787.
 128. Seya, T., T. Hara, M. Matsumoto, and H. Akedo. 1990. Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement. High expression of MCP on human leukemia cell lines, which is down-regulated during cell differentiation. *Journal of immunology* 145:238-245.

129. Sheshberadaran, H., S. N. Chen, and E. Norrby. 1983. Monoclonal antibodies against five structural components of measles virus. I. Characterization of antigenic determinants on nine strains of measles virus. *Virology* 128:341-353.
130. Sheshberadaran, H., and E. Norrby. 1986. Characterization of epitopes on the measles virus hemagglutinin. *Virology* 152:58-65.
131. Sheshberadaran, H., E. Norrby, and K. W. Rammohan. 1985. Monoclonal antibodies against five structural components of measles virus. II. Characterization of five cell lines persistently infected with measles virus. *Archives of virology* 83:251-268.
132. Sheshberadaran, H., and L. G. Payne. 1988. Protein antigen-monoclonal antibody contact sites investigated by limited proteolysis of monoclonal antibody-bound antigen: protein "footprinting". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:1-5.
133. Shi, J., J. Zheng, H. Huang, Y. Hu, J. Bian, D. Xu, and F. Li. 2011. Measles incidence rate and a phylogenetic study of contemporary genotype H1 measles strains in China: is an improved measles vaccine needed? *Virus genes* 43:319-326.
134. Shingai, M., M. Ayata, H. Ishida, I. Matsunaga, Y. Katayama, T. Seya, H. Tatsuo, Y. Yanagi, and H. Ogura. 2003. Receptor use by vesicular stomatitis virus pseudotypes with glycoproteins of defective variants of measles virus isolated from brains of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *The Journal of general virology* 84:2133-2143.
135. Song, M. K., C. J. Vindurampulle, A. V. Capozzo, J. Ulmer, J. M. Polo, M. F. Pasetti, E. M. Barry, and M. M. Levine. 2005. Characterization of immune responses induced by intramuscular vaccination with DNA vaccines encoding measles virus hemagglutinin and/or fusion proteins. *Journal of virology* 79:9854-9861.
136. Sood, D. K., S. Kumar, S. Singh, S. B. Sharma, J. Sokhey, and H. Singh. 1995. Transplacental immunity and waning of maternal antibody in measles. *Indian journal of pediatrics* 62:95-99.
137. Spalke, G., and C. Eschenbach. 1979. Infantile cortical measles inclusion body encephalitis during combined treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of neurology* 220:269-277.
138. Sparrer, K. M., C. K. Pfaller, and K. K. Conzelmann. 2012. Measles virus C protein interferes with Beta interferon transcription in the nucleus. *Journal of virology* 86:796-805.
139. Stahl, C., T. Staehelin, and V. Miggiano. 1983. Spleen cell analysis and optimal immunization for high-frequency production of specific hybridomas. *Methods in enzymology* 92:26-36.

140. Strebel, P. M., S. L. Cochi, E. Hoekstra, P. A. Rota, D. Featherstone, W. J. Bellini, and S. L. Katz. 2011. A world without measles. *The Journal of infectious diseases* 204 Suppl 1:S1-3.
141. Tahara, M., M. Takeda, F. Seki, T. Hashiguchi, and Y. Yanagi. 2007. Multiple amino acid substitutions in hemagglutinin are necessary for wild-type measles virus to acquire the ability to use receptor CD46 efficiently. *Journal of virology* 81:2564-2572.
142. Takeuchi, K., N. Miyajima, N. Nagata, M. Takeda, and M. Tashiro. 2003. Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism. *Virus research* 94:11-16.
143. Tamin, A., P. A. Rota, Z. D. Wang, J. L. Heath, L. J. Anderson, and W. J. Bellini. 1994. Antigenic analysis of current wild type and vaccine strains of measles virus. *The Journal of infectious diseases* 170:795-801.
144. Tanaka, K., H. Minagawa, M. F. Xie, and Y. Yanagi. 2002. The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150). *Archives of virology* 147:195-203.
145. Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406:893-897.
146. Valdespino-Gomez, J. L., M. de Lourdes Garcia-Garcia, J. Fernandez-de-Castro, A. M. Henao-Restrepo, J. Bennett, and J. Sepulveda-Amor. 2006. Measles aerosol vaccination. *Current topics in microbiology and immunology* 304:165-193.
147. van Binnendijk, R. S., S. van den Hof, H. van den Kerkhof, R. H. Kohl, F. Woonink, G. A. Berbers, M. A. Conyn-van Spaendonck, and T. G. Kimman. 2003. Evaluation of serological and virological tests in the diagnosis of clinical and subclinical measles virus infections during an outbreak of measles in The Netherlands. *The Journal of infectious diseases* 188:898-903.
148. Veillette, A., and S. Latour. 2003. The SLAM family of immune-cell receptors. *Current opinion in immunology* 15:277-285.
149. Voet, D. V., JG (ed.). 1994. *Biochemie*, vol. 1. VCH Verlagsgesellschaft mbH.
150. Waku-Kouomou, D., F. Freymuth, I. P. du Chatelet, T. F. Wild, and B. Horvat. 2010. Co-circulation of multiple measles virus genotypes during an epidemic in France in 2008. *Journal of medical virology* 82:1033-1043.
151. Wei, C. J., J. C. Boyington, K. Dai, K. V. Houser, M. B. Pearce, W. P. Kong, Z. Y. Yang, T. M. Tumpey, and G. J. Nabel. 2010. Cross-neutralization of 1918 and 2009 influenza viruses: role of glycans in viral evolution and vaccine design. *Science translational medicine* 2:24ra21.
152. Wei, X., J. M. Decker, S. Wang, H. Hui, J. C. Kappes, X. Wu, J. F. Salazar-Gonzalez, M. G. Salazar, J. M. Kilby, M. S. Saag, N. L. Komarova, M. A. Nowak, B. H. Hahn, P.

- D. Kwong, and G. M. Shaw. 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422:307-312.
153. Welstead, G. G., E. C. Hsu, C. Iorio, S. Bolotin, and C. D. Richardson. 2004. Mechanism of CD150 (SLAM) down regulation from the host cell surface by measles virus hemagglutinin protein. *Journal of virology* 78:9666-9674.
154. WHO. April 2012. Measles, Fact sheets. WHO.
155. WHO. 2012. Measles virus nomenclature update: 2012. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 87:73-80.
156. WHO. 2011. Report of the Meeting of Second South-East Asia Regional Technical Advisory Group on Immunization (SEAR ITAG).
157. Wichmann, O., W. Hellenbrand, D. Sagebiel, S. Santibanez, G. Ahlemeyer, G. Vogt, A. Siedler, and U. van Treeck. 2007. Large measles outbreak at a German public school, 2006. *The Pediatric infectious disease journal* 26:782-786.
158. Wichmann, O., A. Siedler, D. Sagebiel, W. Hellenbrand, S. Santibanez, A. Mankertz, G. Vogt, U. van Treeck, and G. Krause. 2009. Further efforts needed to achieve measles elimination in Germany: results of an outbreak investigation. *Bulletin of the World Health Organization* 87:108-115.
159. Wild, T. F., E. Malvoisin, and R. Buckland. 1991. Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *The Journal of general virology* 72 (Pt 2):439-442.
160. Yanagi, Y., N. Ono, H. Tatsuo, K. Hashimoto, and H. Minagawa. 2002. Measles virus receptor SLAM (CD150). *Virology* 299:155-161.
161. Yanagi, Y., M. Takeda, and S. Ohno. 2006. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *The Journal of general virology* 87:2767-2779.
162. Zhao, H., P. S. Lu, Y. Hu, Q. Wu, W. Yao, and Y. H. Zhou. 2010. Low titers of measles antibody in mothers whose infants suffered from measles before eligible age for measles vaccination. *Virology journal* 7:87.
163. Zhou, D., Y. Zhang, Q. Li, Y. Chen, B. He, J. Yang, H. Tu, L. Lei, and H. Yan. 2011. Matrix protein-specific IgA antibody inhibits measles virus replication by intracellular neutralization. *Journal of virology* 85:11090-11097.
164. Ziegler, D., P. Fournier, G. A. Berbers, H. Steuer, K. H. Wiesmuller, B. Fleckenstein, F. Schneider, G. Jung, C. C. King, and C. P. Muller. 1996. Protection against measles virus encephalitis by monoclonal antibodies binding to a cystine loop domain of the H protein mimicked by peptides which are not recognized by maternal antibodies. *The Journal of general virology* 77 (Pt 10):2479-2489.

13. Liste eigener Veröffentlichungen

Paper

The Journal of General Virology 2009

Measles viruses of genotype H1 evade recognition by vaccine-induced antibodies targeting the linear hemagglutinin noose epitope

T. Finsterbusch, A. Wolbert, I. Deitemeier, K. Meyer, M. M. Mosquera, A. Mankertz, S. Santibanez

Vorträge

Tagung der European Society for Clinical Virology, London, Januar 2011

Current measles viruses evade recognition by several neutralizing hemagglutinin specific antibodies

K. Meyer, T. Finsterbusch, A. Wolbert, I. Deitemeier, A. Mankertz, S. Santibanez

9. Workshop der Gesellschaft für Virologie-Arbeitskreises „Immunbiologie von Virusinfektionen“, Deidesheim, Oktober 2010

Diversity of neutralizing epitopes of measles wildtype and vaccine virus hemagglutinin

K. Meyer, T. Finsterbusch, A. Wolbert, I. Deitemeier, A. Mankertz, S. Santibanez

Poster

21. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Freiburg, März 2011

Mutation in neutralizing hemagglutinin noose epitope of measles virus genotype D8 prevents recognition by a vaccine-induced antibody

K. Meyer, A.-H. Weiß, I. Deitemeier, T. Finsterbusch, A. Wolbert, A. Mankertz, S. Santibanez

19. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Leipzig, März 2009

Diversity of neutralizing epitopes of the measles virus hemagglutinin

K. Meyer, T. Finsterbusch, A. Wolbert, I. Deitemeier, A. Mankertz, S. Santibanez

14. Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Frau PD Dr. Annette Mankertz und Frau Dr. Sabine Santibanez vom Nationalen Referenzzentrum Masern, Mumps, Röteln am Robert Koch-Institut (RKI) für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung während der Promotion bedanken. Ich bedanke mich zusätzlich bei Frau PD Dr. Annette Mankertz und Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel für die Übernahme des Gutachtens.

Ein großes Dankeschön möchte ich Herrn Dr. Mick Mulders und seinen Kollegen von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für die finanzielle Unterstützung und den Einblick in die Arbeit der WHO und des Measles and Rubella Laboratory Network aussprechen. Für die Bereitstellung monoklonaler Antikörper bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Dr. Guy A. M. Berbers vom RIVM, Bilthoven, und Herrn Dr. Claude P. Muller vom Institut für Immunologie, Luxembourg. Herzlichen Dank an Herrn Dr. Jürgen Schneider-Schaulies von der Universität Würzburg für die zur Verfügung gestellten CHO-SLAM Zellen.

Bei Frau Dr. Brigitte Dorner, Herrn Dr. Sebastian Voigt und den Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppen im RKI möchte ich mich für die jederzeit gewährte, geduldige Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft rund um das Thema Antikörper bedanken.

Meinen jetzigen und ehemaligen Arbeitskollegen danke ich sehr für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein extra großes Dankeschön gilt an dieser Stelle Ingrid Deitemeier für stetige Hilfsbereitschaft und ihre vielen aufmunternden Worte. Vielen Dank an Tim Finsterbusch, Jakob Ettinger und Nicole Friedrich für die unendliche Geduld meine Fragen zu beantworten und für die vielen Denkanstöße! Skadi Kull danke ich für die intensive Einarbeitung in die Massenspektrometrie.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden.

15. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.