

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Ingo Drexler

GENETISCHE UND ANTIGENETISCHE VARIABILITÄT DES
HUMANEN RESPIRATORISCHEN SYNZYTIALVIRUS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Judith Werzmirzowsky
2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. Adams

Korreferentin: Prof. Dr. Schuster

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Adams, O., Werzmirzowsky, J., Hengel, H. 2013. Genetic analysis and antigenic characterization of human respiratory syncytial virus group A viruses isolated in Germany 1996-2008. *Virus Genes*. **47**(2) 210-8.

Zusammenfassung

Das Respiratorische Synzytialvirus (RSV) zählt zu den häufigsten Erregern oberer Atemwegsinfektionen. Erstinfektionen finden meist im Säuglingsalter statt, Reinfektionen sind häufig, die Entwicklung eines Impfstoffes verlief bisher erfolglos. Eine Erklärung dafür ist die genetische und antigenetische Variabilität des Virus. Neben den beiden Subgruppen RSV A und RSV B wurden bislang sieben RSV-A-Genotypen identifiziert, die sich vor allem in der Sequenz ihres G-Proteins unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 23 durch Zufall ausgewählte RSV-Wildisolate aus Düsseldorf aus den Jahren 1998-2008 untersucht. Es erfolgte eine Sequenzierung der F- und G-Protein-kodierenden Bereiche sowie eine Testung der Isolate im ELISA und Neutralisationstest mit definierten monoklonalen Antikörpern. Mit Hilfe der Sequenzierung ließen sich die 18 RSV-A-Isolate den Genotypen GA5 und GA2 zuordnen, wobei ein Wechsel des Genotyps im Jahr 2003 erfolgte. Während das RSV-F-Protein weitestgehend konserviert ist, fanden sich im G-Protein Bereiche von hoher Variabilität. Bei der Untersuchung der potentiellen Glykosylierungsstellen zeigte sich ein Verlust von N-Glykosylierungssequenzen bei jüngeren RSV-Wildisolaten, was als ein Hinweis auf das Vorliegen eines positiven Immunselektionsdruckes gewertet werden kann.

Die monoklonalen RSV-F-Antikörper zeigten eine konstante Reaktivität mit den Wildisolaten. Bei den RSV-G-Antikörpern ließ sich ein Zusammenhang zwischen Reaktivitätsausfällen und fehlenden bzw. veränderten Glykosylierungssequenzen feststellen. Bei laut Literatur als stammspezifisch klassifizierten Antikörpern fand sich ein Reaktivitätsverlust, der sich bei den zeitlich jüngeren Isolaten zunehmend stärker ausprägte. Dies sind Hinweise auf das Vorliegen von systematischen progressiven Mutationen, ebenso wie die Tatsache, dass sich in der vorliegenden Arbeit bei vier Wildisolaten Mutationen fanden, die zuvor nur bei in vitro Escape-Mutanten beschrieben wurden.

Im Neutralisationstest konnte nur der in der Prophylaxe eingesetzte Synagis®-Antikörper alle untersuchten RSV-Isolate neutralisieren, wohingegen die RSV-G-Antikörper die Wildisolate gar nicht oder nur partiell neutralisierten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Immunselektion durch Antikörper im Sinne eines Antigen drifts ein entscheidender Faktor bei der Evolution des Humanen Respiratorischen Synzytialvirus ist.

Liste der verwendeten Abkürzungen:

A	Alanin
Abb.	Abbildung
AAD	Amino Acid divergenz
BSA	Rinderserum-Albumin
C	Cystein
CD14	Glykoprotein CD14 (cluster of differentiation)
CD4⁺/8⁺	Glykoprotein CD4-/CD8-positive Zellen
cDNA	Komplementäre DNA
CPE	Cytopathischer Effekt
Cp-Mutante	Cold passaged Mutante
D	Aspartat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DMEM	Dulbecco's modified Eage'l's Medium
Dn	Nicht-synonyme Mutation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
Ds	Synonyme Mutation
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure x Na ₂ -Salz
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
F	Phenylalanin
FCS	Fötales Kälberserum
F-Protein	Fusionsprotein
G	Glycin
G-Protein	Glykoprotein
H	Histidin
H-Protein	Hämagglutinin-Protein
HEp2	Humane Larynx-Carcinom-Zelllinie
Hi-Di Formamide	Highly deionized formamide
HN-Protein	Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein
HPLC-H₂O	High-performance liquid chromatography H ₂ O
HRPO	Horse-radish-peroxidase
I	Isoleucin
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IL	Interleukin

IFN	Interferon
IgA/IgE/IgG/IgM	Immunglobulin A/E/G/M
SEM	Standard error of the mean
SH-Protein	Small hydrophobic Protein
SNAP	Synonymous Non-synonymous Analysis Program
Sog.	Sogenannt
T	Threonin
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat mit EDTA
TCID50	Tissue Culture Infectious Dosis 50
A	Alanin
Abb.	Abbildung
AAD	Amino Acid divergenz
BSA	Rinderserum-Albumin
C	Cystein
CD14	Glykoprotein CD14 (cluster of differentiation)
CD4⁺/8⁺	Glykoprotein CD4-/CD8-positive Zellen
cDNA	Komplementäre DNA
CPE	Cytopathischer Effekt
Cp-Mutante	Cold passaged Mutante
D	Aspartat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DMEM	Dulbecco's modified Egel's Medium
Dn	Nicht-synonyme Mutation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
Ds	Synonyme Mutation
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure x Na ₂ -Salz
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
F	Phenylalanin
FCS	Fötale Kälberserum
F-Protein	Fusionsprotein
G	Glycin
G-Protein	Glykoprotein

H	Histidin
H-Protein	Hämagglutinin-Protein
HEp2	Humane Larynx-Carcinom-Zelllinie
Hi-Di Formamide	Highly deionized formamide
HN-Protein	Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein
HPLC-H₂O	High-performance liquid chromatography H ₂ O
HRPO	Horse-radish-peroxidase
I	Isoleucin
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IgA/IgE/IgG/IgM	Immunglobulin A/E/G/M
SEM	Standard error of the mean
SH-Protein	Small hydrophobic Protein
SNAP	Synonymous Non-synonymous Analysis Program
Sog.	Sogenannt
T	Threonin
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat mit EDTA
TCID₅₀	Tissue Culture Infectious Dosis 50

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Paramyxoviren	1
1.1.1	Einteilung	1
1.1.2	Morphologie	2
1.2	RSV	3
1.2.1	Geschichte	3
1.2.2	Morphologie und Virusproteine	3
1.2.3	Genom	9
1.2.4	Replikationszyklus	10
1.2.5	RSV Subgruppen.....	12
1.2.6	Epidemiologie	13
1.2.7	Klinik und Pathogenese.....	14
1.2.8	Therapie und Prophylaxe.....	16
1.3	Fragestellung	19
2	MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1	Isolierung von RSV in der Zellkultur	20
2.2	Extraktion der RNA	21
2.2.1	Prinzip	21
2.2.2	Reagenzien	21
2.3	Reverse Transkription	22
2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.4.1	Konventionelle PCR.....	22
2.4.2	Nested-PCR.....	24
2.4.3	Real-time-PCR	25
2.5	Aufreinigung von PCR-Produkten	27
2.5.1	Materialien	27
2.5.2	Prinzip	27
2.5.3	Durchführung	27
2.6	Sequenzierung	28
2.6.1	Prinzip	28
2.6.2	Auswertung	28

2.6.3	Material und Methoden	30
2.7	Aufreinigung der Sequenzierprodukte	32
2.8	ELISA	33
2.8.1	Gewinnung von Antigen	33
2.8.2	Materialien	33
2.8.3	Proteinbestimmung nach Bradford	35
2.8.4	Durchführung des ELISAs	35
2.9	RSV-Antigennachweis in infizierten Zellen mittels ELISA	36
2.9.1	Materialien	36
2.9.2	Durchführung	37
2.10	TCID50	37
2.10.1	Materialien	37
2.10.2	Durchführung	37
2.11	Neutralisationstest	38
2.11.1	Materialien	38
2.11.2	Durchführung	39
2.12	Testung zum Vorliegen eines Antikörper Enhancements	41
3	RESULTATE	43
3.1	Genetische Analyse	43
3.1.1	RSV-A F-Protein	43
3.1.2	RSV-A G-Protein	44
3.1.3	RSV-B	47
3.2	Nukleotid- und Aminosäuredivergenz	49
3.3	Glykosylierung des G-Proteins	52
3.4	ELISA	56
3.5	TCID50	59
3.6	Neutralisationstest	59
3.7	Antikörper-Enhancement	62

4	DISKUSSION	63
4.1	Dominanz der RSV-Genotypen	63
4.2	Glykosylierungssequenzen des RSV-G-Proteins	64
4.3	Hinweise auf das Vorliegen einer Immunselektion	67
4.4	Neutralisation durch monoklonale Anti-RSV-G-Antikörper	69
4.4.1	Einteilung in Subgruppen- und gruppenspezifische Antikörper.....	69
4.4.2	Wirkung von Antikörper-Cocktails.....	70
4.5	Neutralisation von RSV-Wildisolaten durch Synagis®	71
4.6	RSV-B-G-Gen-Duplikation	72
5	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	74
6	LITERATUR	76

1 Einleitung

1.1 Paramyxoviren

1.1.1 Einteilung

Paramyxoviren sind weit verbreitete Krankheitserreger. Sie verursachen Erkrankungen mit teils schwerem Verlauf bei Menschen und Tieren. Man unterscheidet zwei Unterfamilien, die Paramyxo- und die Pneumovirinae. Eine weitere Unterteilung erfolgt auf Grund von Genabfolge, unterschiedlichen Membranproteinen und deren Funktion.

Unterfamilie	Genus	Mensch		Tier
Paramyxovirinae	Respirovirus	Parainfluenzavirus 1 und 3	Typen	Bovines Parainfluenzavirus Typ 3 Sendaivirus (murines Parainfluenzavirus, Typ 1)
			Typen	Canines Parainfluenzavirus Typ 2 (Simian-Virus 5)
	Rubulavirus	Mumpsvirus Parainfluenzavirus 2, 4a und b		Newcastle-Disease-Virus (Geflügel) Vogelparamyxoviren Typen 2-9
	Avulavirus			Hundestaupavirus Phocine Staupeviren (Robbenstaupe) Rinderpestvirus Peste-des-Petits- Ruminants-Virus (PPRV)
	Morbillivirus	Masernvirus		Hendravirus (Pferd) Menanglevirus (Schwein) Nipahvirus (Schwein, Hund)
Pneumovirinae	Pneumovirus	Respiratory Virus (RSV)	Syncytial	Bovines Respiratory Syncytial Virus
	Metapneumovirus	Humanes Metapneumovirus		Rhinotracheitisvirus (Pute)

Tabelle 1: Einteilung der Paramyxoviren

Während die Respiro-, Rubula- und Avulaviren sowohl eine Neuraminidase- als auch eine Hämagglutinationsaktivität aufweisen, fehlt den Morbilliviren erstere. Die Rubulaviren tragen auf ihrer Oberfläche zusätzlich das sog. SH- (*small hydrophobic*-) Protein (s.1.1.2). Die Pneumoviren haben weder eine Neuraminidase noch eine Hämagglutinationsaktivität. Ihre beiden Vertreter, das RS-Virus und das Metapneumovirus, unterscheiden sich in der Abfolge der Gene. Allen Paramyxoviren gemeinsam sind der Partikelbau, die Replikationsmechanismen sowie das durchgehende RNA-Genom.

1.1.2 Morphologie

Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von etwa 150 bis 300 nm und eine meist sphärische, seltener eine filamentöse Form. Das Genom besteht aus einer nichtsegmentierten, einzelsträngigen RNA in Negativstrangorientierung mit einer Länge von 13 373 bis 18 246 Basen. Im Komplex mit P-, L-, N- oder NP-Proteinen bildet es das Nucleocapsid in Form einer linksgängigen Helix mit einem Durchmesser von 14 bis 17 nm und einem Hohlzylinder von etwa 5 nm Durchmesser im Innern. Durch die hohe Proteinbeladung wird ein Schutz vor Nucleasen und die für die Verpackung notwendige Flexibilität gewährleistet. Das N- bzw. NP- (*Nucleocapsid*-) Protein bildet die Hauptkomponente des Nucleocapsids. Ein N-Protein bindet an etwa sechs Basen des viralen Genoms. L- (*Large*-) und P- (*Phospho*-) Protein sind durch nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem N-Protein und der RNA verbunden. Die RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität des L-Proteins wird durch das P-Protein unterstützt (91).

Das Nucleocapsid wird von einer von der Wirtszelle stammenden Membranhülle umgeben, in die neben zelleigenen auch virale Oberflächenproteine eingelagert sind. Diese dienen der Adsorption an die Wirtszelle (HN-, H-, G-Protein) und der Fusion mit deren Zellmembran (F-Protein). Das H-Protein der Morbilliviren besitzt außerdem eine Hämagglutinationsaktivität, das HN-Protein der Respiro-, Rubula- und Avulaviren übt zusätzlich die Funktion einer Neuraminidase aus. Die Innenseite der Membranhülle wird vom M- (*Matrix*-) Protein ausgekleidet, welches mit dem N-Protein des Nucleocapsids interagiert (91).

1.2 RSV

1.2.1 Geschichte

Das Respiratorische Synzytialvirus wurde erstmals 1956 aus Laborschimpansen, die an einer Erkältung litten, isoliert (26,93). Ein Jahr später gelang der Nachweis des Virus auch bei Kindern mit Erkrankungen der Luftwege (23,26). Robert M. Chanock erwähnte erstmals den Namen „*respiratory syncytial virus*“ auf Grund des charakteristischen zytopathologischen Effektes. In der Folgezeit wurde die Bedeutung des Virus als häufigster Erreger schwerer Infektionen des Respirationstraktes, besonders im Kindesalter, ersichtlich.

1.2.2 Morphologie und Virusproteine

Das infektiöse Viruspartikel hat einen Durchmesser von 150 bis 300 nm und eine sphärische Form (16). Wie bei allen Paramyxoviren wird auch beim RS-Virus das Nucleocapsid von einer Membranhülle umgeben, die von der Wirtszelle stammt. In die Membran sind drei viral kodierte Oberflächenproteine in Form von sog. „*Spikes*“ eingelagert: Das F-, G- und das SH-Protein. Diese Proteinvorsprünge haben eine Länge von 11 bis 20 nm und einen Abstand untereinander von 6 bis 10 nm (26). An der Innenseite der Membranhülle findet sich das M-Protein. Das Nucleocapsid hat einen Durchmesser von 15 bis 18 nm (26) und enthält das N-, P-, L- und das M2-1-Protein (s. Abb. 1, 2). Das Genom des Virus besteht aus elf identifizierten Genen, die die viralen Proteine kodieren.

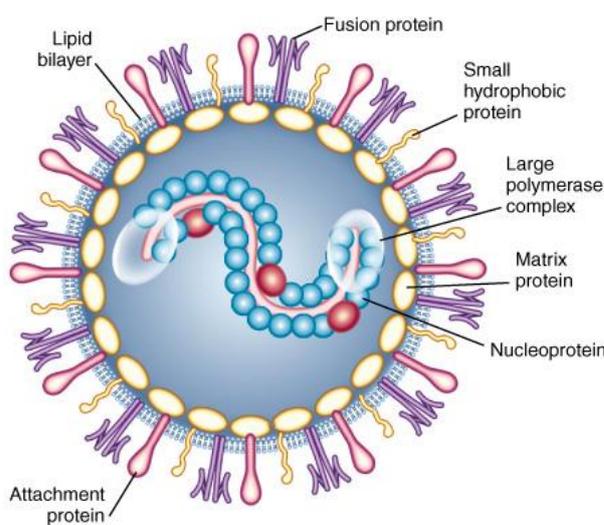


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Respiratorischen Synzytialvirus

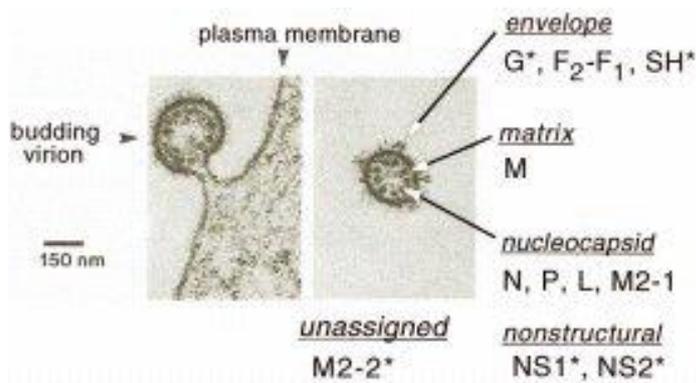


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen: Links Ausstülpung des Virus aus der Wirtszelle, rechts freies Virus mit Virusproteinen, Vergrößerung 132,000 (26)

1.2.2.1 F-Protein

Das als Trimer (18) vorliegende Fusions-Protein dient der Fusion der Virushüllmembran mit der Membran der Wirtszelle, wodurch das Nucleocapsid in die Zelle gelangt. Wird es auf der Oberfläche der Zelle exprimiert, vermittelt es, vermutlich durch Interaktion mit dem zellulären Protein RhoA, die Fusion mit Nachbarzellen. Dies führt zu der Bildung der charakteristischen Synzytien (57,105,106) (s. Abb. 3).

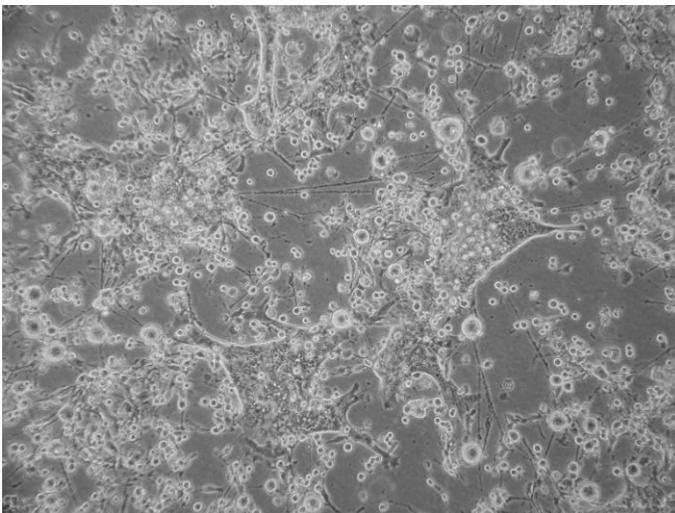


Abb. 3: **Synzytienbildung** bei mit RSV-Long-Strain infizierten HEp2-Zellen

Zunächst wird eine Vorläuferform, das F_0 -Protein, synthetisiert. Dieses hat ein Molekulargewicht von etwa 45 kd. Ein Signalpeptid am aminoterminalen Ende ermöglicht den Transport zum endoplasmatischen Retikulum. Dort wird das Protein nach Durchtritt durch die Membran über eine hydrophobe Region am carboxyterminalen Ende verankert, das Signalpeptid wird abgespalten (91). Während des Transports durch den Golgi-Apparat erfolgt die Glykosylierung sowie die Spaltung in F_1 - und F_2 -Protein durch eine zelluläre Protease, vermutlich die ubiquitär vorkommende Furinprotease, zwischen den Aminosäuren Arginin

und Lysin (26,29,83). Die beiden Anteile des F-Proteins sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (58). Das F₁-Protein besteht aus den Aminosäureresten 137 bis 574, ist in der Membran verankert und enthält am aminoterminalen Ende eine hydrophobe Region aus etwa 25 Aminosäuren, die die Fusion der viralen mit der zellulären Membran vermitteln (26,91). Die Aminosäurereste 1 bis 130 bilden das F₂-Protein.

1.2.2.2 G-Protein

Das der Adsorption an die Wirtszelle dienende Glykoprotein G liegt als Homooligomer, vermutlich Trimer oder Tetramer, vor. Es hat eine Länge von 289 bis 299 Aminosäuren (26). Obwohl es dieselbe Funktion ausübt wie die HN- bzw. H-Proteine der anderen Paramyxoviren, finden sich keine Übereinstimmungen in Sequenz und Struktur. Das Protein ist ein Typ II Transmembranprotein mit einer hydrophoben Region aus 25 bis 30 Aminosäuren am aminoterminalen Ende (26,91). Diese übt eine Signalfunktion aus und ermöglicht den Transport zum endoplasmatischen Retikulum. Als Transmembranregion dient sie zudem der Verankerung des Proteins in der Zellmembran, sodass das aminoterminal Ende im Zellinneren zum Liegen kommt. Das carboxyterminale Ende gelangt nach Glykosylierung in den Extrazellulärraum. Im Gegensatz zu dem Signalpeptid des F₀-Peptids wird die hydrophobe Region des G-Proteins nicht abgespalten.

Bedingt durch ein zweites Startsignal im *open reading frame*, welches im Bereich des Membranankers liegt (Aminosäure 48), existiert eine freie Form des G-Proteins, die sezerniert wird (26,66,115). Sie scheint 24 Stunden nach Infektion einen Anteil von fast 80% der G-Proteine zu bilden. Vermutlich erfolgt nach der Translation eine Proteolyse, bei der die aminoterminalen 65 bzw. 74 Aminosäuren abgespalten werden. Die Funktion dieses Proteins ist nicht abschließend geklärt. Es ist möglich, dass es die Immunantwort beeinflusst oder neutralisierende Antikörper bindet und so die infektiösen Partikel vor diesen schützt.

Das G-Protein ist neben der Palmitylierung in hohem Maße glykosyliert. Zunächst werden während der Translation vermutlich vier Seitenketten N-glykosidisch mit dem Protein verbunden. Die Kohlenhydrate binden dabei an die Aminosäure Asparagin. Die erforderliche Aminosäuresequenz für die N-glykosidische Bindung ist Asparagin-X-Threonin/Serin, wobei X nicht Prolin sein darf (82,113). Es entsteht vorübergehend ein Glykoprotein vom mannosereichen Typ mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kD (144). Nach der Bildung von Homooligomeren erfolgt eine weitere Glykosylierung im Golgi-Apparat. Die N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidketten werden dort zum komplexen Typ (144). Des Weiteren werden nun Kohlenhydratseitenketten O-glykosidisch an Serin- und Threoninreste

gebunden (26,91,143). Subtypspezifische Bindungsstellen (T^{241} für GA2 und GA7, T^{274} für GA5) sind beschrieben (113). Potentielle ausgedehnte O-glykosidische Bindungsstellen sind durch die Aminosäurefolge Lysin-Prolin- X_n -Threonin-Threonin-Lysin- X_n gekennzeichnet (113,116). Vor allem durch die O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide erreicht das G-Protein ein Molekulargewicht von etwa 90 kd (143,144). Je nach Zellart, die für die Anzucht von RSV in der Zellkultur verwendet wird, erreicht das G-Protein einen unterschiedlichen Glykosylierungsgrad, der sich auch in der Reaktivität mit neutralisierenden Antikörpern widerspiegelt (53). Vermutlich wird dies durch das Vorhandensein verschiedener N-Acetyl-Galaktosaminyltransferasen verursacht. Die Ektodomäne des G-Proteins ist durch einen hohen Anteil an Prolin gekennzeichnet (26).

Ein weiteres Kennzeichen des G-Proteins ist die hohe Variabilität in der Sequenz. Dies ist besonders in der Ektodomäne ausgeprägt, bei der nur etwa 44% der Aminosäurefolge zwischen den Subgruppen identisch sind, eine Beobachtung, die mit Unterschieden in der Reaktivität mit neutralisierenden Antikörpern korreliert und darauf hindeutet, dass das G-Protein eines der wichtigsten protektiven Antigene darstellt. Die Akkumulation von Veränderungen in der Aminosäuresequenz deutet möglicherweise auf einen Antigendrift durch Immunselektion hin (22). Gut konserviert sind die transmembranäre und die cytoplasmatische Domäne, die hydrophoben Regionen sowie eine zentrale Region des Proteins (Aminosäurereste 164 bis 176) in der Ektodomäne (72,86). Letztere wird von zwei Muzin-ähnlichen, variablen Segmenten flankiert. In enger räumlicher Beziehung dazu finden sich vier Cysteinreste (Positionen 173, 176, 182, 186). Jeweils zwei sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden und bilden zusammen eine Kurve oder auch Cystein-Nase, die vermutlich wichtig für die Adsorption des Virus an die Wirtszelle ist (26,56,80). Die Aminosäuren 184 bis 198 könnten in Form einer Heparin-Bindungsstelle der Bindung an zelluläre Glykosaminoglykane dienen (26,44). Einige RSV-Isolate des Genotyps B sind durch eine Duplikation von 60 Nukleotiden im Gen des G-Proteins gekennzeichnet (136,137). Sie entwickelten sich möglicherweise alle aus einem Virusisolat, welches wahrscheinlich in der Saison 1998/1999 zirkulierte.

Trotz der wichtigen Funktion des G-Proteins, die Adsorption an die Wirtszelle zu vermitteln, scheint das Respiratorische Synzytialvirus nicht unbedingt auf das Protein angewiesen zu sein. So zeigte eine Studie, dass das B1cp-52 Isolat, ein aus Vero-Zellpassagen gewonnenes RSV-Isolat der Subgruppe B1, dem sowohl das G- als auch das SH-Protein fehlte, replikationsfähig blieb (74). RSV könnte demnach auch andere Mechanismen haben, die ihm die Adsorption ermöglichen.

1.2.2.3 SH-Protein

Ein weiteres Protein, das an der Oberfläche des RS-Virus exprimiert wird, ist das sog. *Small Hydrophobic Protein*. Es ist mit den Aminosäuren 14 bis 41, einer hydrophoben Region, die als Signalpeptid fungiert, in der Membranhülle verankert, sodass der C-Terminus extrazellulär zu finden ist (26,30). Von dem SH-Protein gibt es vier verschiedene Formen: SH₀ ist nicht glykosyliert und hat ein Molekulargewicht von 7,5 kd. SH_g besitzt im Unterschied dazu eine Kohlenhydratseitenkette, die mit dem Protein N-glykosidisch verbunden ist. Auch das SH_p-Protein ist glykosyliert. Bei dieser Form ist die Seitenkette zusätzlich mit einem Polylactosaminoglykan verbunden. Schließlich findet man in der Wirtszelle das etwas kürzere SH_t-Protein, welches nicht glykosyliert ist und dadurch entsteht, dass die Translation an dem zweiten Methionin-Codon des *open reading frames* beginnt. Bedingt durch die unterschiedlichen Modifikationen erreicht das SH-Protein ein Molekulargewicht von 4,8 bis etwa 60 kd. Die verschiedenen Formen sind zu Oligomeren, zumindest Pentameren, assoziiert (26).

Die Funktion des SH-Proteins ist noch ungeklärt. Man vermutet, dass es zwar die Virusreplikation verstärkt, jedoch für die Infektiosität des Virus nicht essentiell ist. Möglich ist auch, dass das Protein Membrankanäle formt, durch die niedergewichtige Moleküle in das Virion gelangen können (108).

1.2.2.4 M-Protein

Das Matrix-Protein hat eine Länge von 256 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 25 kd. Es bildet eine Matrixschicht, die die Innenseite der Hüllmembran des Virus auskleidet. Über eine hydrophobe Region im Bereich des C-Terminus kommt es vermutlich zu einer Interaktion mit der Membran. Eine weitere Wechselwirkung besteht zwischen dem M-Protein und den Proteinen des Nucleocapsids. Das Protein ist essentiell für die Bildung der Viruspartikel (132). Es vermittelt die Assoziation zwischen Nucleocapsid und Virushülle und verhindert die Transkription des Genoms vor dem Verpacken der RNA (26,91).

1.2.2.5 Proteine des Nucleocapsids

Das Nucleocapsid wird neben der RNA aus den N-, P- und L-Proteinen gebildet. Alle Proteine des Nucleocapsids sind in ihrer Funktion aufeinander angewiesen und wirken nur im Komplex. Intrazellulär finden sie sich in Einschlusskörperchen (50).

Das aus 391 Aminosäuren bestehende Nucleocapsid-N-Protein bindet mit einer aminoterminalen Region an die RNA und schützt das Genom vor einer unspezifischen RNase Aktivität. Es hat ein Molekulargewicht von 45 kd. Die carboxyterminale Region interagiert mit den anderen Proteinen des Nucleocapsids. Die Wechselwirkung mit dem M-Protein garantiert die korrekte Verpackung des Genoms. In seiner Funktion ist das N-Protein auf das Phosphoprotein angewiesen. Letzteres scheint als Chaperon für freies N-Protein zu wirken. Das P-Protein hat eine Länge von 241 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 33 kd. Die Phosphorylierung erfolgt wahrscheinlich vor allem mit Hilfe der zellulären Kaseinkinase. Die Phosphatreste sind an Serin (Positionen 116, 117, 119, 232, 237) gebunden und essentiell für die Funktion des Proteins als stabilisierender Kofaktor der Polymerase (12,120).

Die Funktion der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase wird von dem aus 2165 Aminosäuren bestehenden *Large-Protein* (Molekulargewicht 250 kd) ausgeübt. Die Proteine finden sich besonders an transkriptionsaktiven Bereichen der RNA und sind hier nichtkovalent miteinander verbunden. Im Komplex mit dem P-Protein katalysiert das L-Protein die Modifizierung der mRNA-Moleküle in Form von *Capping* und Methylierung am 5'-Ende sowie Polyadenylierung am 3'-Ende. Vermutlich ist es auch an der Phosphorylierung des P-Proteins als Proteinkinase beteiligt (91,129).

Schließlich findet sich im Proteinkomplex des Nucleocapsids das phosphorylierte M2-1 Protein (194 Aminosäuren, Molekulargewicht 22 kd). Dieses wirkt als Antiterminator und reguliert dadurch den Übergang zwischen Transkription und Replikation (27,42,64,64). Kodiert wird es durch den *open reading frame* in der Nähe des 5'-Endes (Nukleotide 10 bis 594) der M2 mRNA. Das Protein bindet an das N-Protein. Im Bereich des N-Terminus findet sich ein Zinkfingermotiv aus Cystein- und Histidinresten.

1.2.2.6 NS1- und NS2-Protein

Im Genom des RS-Virus finden sich auch die Sequenzen für zwei Nichtstrukturproteine, das NS1- und das NS2-Protein. Ersteres ist mit 139 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 13,8 kd etwas länger als das NS2-Protein, welches aus 124 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 14,5 kd aufweist. Beide Proteine liegen als Homooligomere vor (37). Besonders das NS1-Protein scheint eine Funktion im Bereich der RNA-Synthese innezuhaben, da Experimente zeigten, dass es einen inhibierenden Effekt sowohl auf die Transkription als auch auf die Replikation hat (11). Viren, denen die Nichtstrukturproteine fehlen, zeigen eine Verzögerung in der Akkumulation von RNA und Protein und ein vermindertes Wachstum, sind aber replikationsfähig und infektiös (26,133,134,145). Ferner

inhibieren die beiden Proteine die Transkription von IFN- α , - β und - λ , insbesondere dadurch, dass sie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 unterdrücken (126,127).

1.2.2.7 M2-2-Protein

Der *open reading frame* des M2-2-Proteins beinhaltet die Nukleotide 563 bis 835 der M2 mRNA und überlappt damit den des M2-1-Proteins (28). Nach Abschluss der Translation des M2-1-Proteins können die Ribosomen erneut an der mRNA initiieren und dadurch die Translation des M2-2-Proteins beginnen (6). Dafür existieren bei der RSV A2 Subgruppe drei Startcodons (6,26). Das M2-2-Protein hat eine Länge von 84 bis 90 Aminosäuren, abhängig von dem genutzten Startcodon, und ein Molekulargewicht von 11 kd. Es ist ein Regulationsfaktor, der einen inhibitorischen Effekt auf die Transkription ausübt und die RNA Replikation fördert. Isolate, denen das M2-2-Protein fehlt, sind im Tierversuch mit Nagetieren und Schimpansen zwar attenuiert, bleiben jedoch replikationsfähig und rufen eine Immunantwort hervor (26,71,134).

1.2.3 Genom

Die einzelsträngige, nicht infektiöse RNA des Respiratorischen Synzytialvirus besteht aus 15.222 Basen und codiert für 10 mRNAs. Diese enthalten mit Ausnahme der mRNA für das M2-Protein (s. 1.2.2.7) jeweils einen *open reading frame* und kodieren für die 11 viralen Proteine. Die mRNA Moleküle sind im Gegensatz zur genomischen RNA und der als Intermediärprodukt entstehenden komplementären antigenomischen RNA am 3'-Ende polyadenyliert und haben eine *Capstruktur* am 5'-Ende (26).

Am 3'-Ende des Genoms befindet sich die sog. *Leadersequenz*. Diese aus 52 bis 54 Basen bestehende Region codiert nicht für Aminosäuren, wird aber transkribiert. Im *Trailer*, einem aus 40 bis 44 Basen bestehenden, nichttranskribierten Bereich am 5'-Ende, liegen die cis-aktiven Initiationssignale. Diese helfen bei der Verpackung der RNA-Moleküle. Im Bereich des *Leaders* und des *Trailers* findet man Sekundärstrukturen in Form von Haarnadelschleifen, die allerdings keine Bedeutung für die Funktion haben (91). Die ersten 24 bis 26 Nukleotide am 3'-Ende der genomischen und der antigenomischen RNA sind sehr gut konserviert und scheinen Teil eines *Promotors* zu sein. Für den Beginn der Replikation werden die ersten 25 Nukleotide, für die Initiation der Transkription die ersten 15 Nukleotide sowie das Startsignal des ersten Gens benötigt (43).

Die zehn Gene zeichnen sich durch konservierte Regionen an Beginn und Ende aus. Das Startsignal, auch *S-Consensus* genannt, hat die Sequenzfolge 3'-CCCCGUUUA(U/C) bzw.

3'-CCCUGUUUUA beim L-Protein. Der Endpunkt bzw. *E-Consensus* aus 12 bis 13 Nukleotiden ist semikonserviert (26,77). Zwischen den ersten neun Genen finden sich 1 bis 56 schlecht konservierte intergenische Nukleotide, die nicht transkribiert werden. Der *S-Consensus* für das L-Protein liegt im *open reading frame* des Gens für das M-Protein. Die Überlappung betrifft 68 Nukleotide (31,41).

1.2.4 Replikationszyklus

Vor Beginn der Replikation muss das Nucleocapsid des Respiratorischen Synzytialvirus in die Wirtszelle gelangen. Zunächst erfolgt daher die Adsorption des Virus an die Zellmembran mit Hilfe des G-Proteins. Dieses scheint an solche zelluläre Glykosaminoglykane zu binden, welche die Disaccharide Heparansulfat und Chondroitinsulfat B enthalten. Der genaue Mechanismus der Bindung ist nicht abschließend geklärt. Möglich wäre eine elektrostatische Interaktion zwischen den negativ geladenen Glykosaminoglykanen und den basischen Aminosäureresten des Proteins (44). Eine andere These ist, dass das Monosaccharid Iduronsäure für die Bindung essentiell ist (61). Es ist möglich, dass die Bindung des G-Proteins an die Zellmembran nur der erste Schritt der Adsorption ist, dem weitere, bisher ungeklärte Schritte folgen. Da das B1 cp-52 Isolat, dem sowohl das G- als auch das SH-Protein fehlt, noch immer infektiös und replikationsfähig ist, scheint es auch einen alternativen Weg der Adsorption zu geben, vermutlich F-Protein vermittelt (74).

Nach erfolgter Adsorption muss die virale Membranhülle mit der Zellmembran der Wirtszelle fusionieren. Diesen Vorgang ermöglicht das F-Protein. Es scheint dabei zu einer Interaktion zwischen dem viralen Protein und dem zellulären Protein RhoA zu kommen (57,105,106). Dieses der Ras-Familie zugehörige Protein kontrolliert zahlreiche Zellfunktionen und ist mit der Innenseite der Membran assoziiert. Die Interaktion mit dem F-Protein erfolgt mit Hilfe der Aminosäuren 146 bis 155 des viralen Proteins sowie 67 bis 110 des Guanosintriphosphates (105,106). Es ist nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt der Fusion bzw. Penetration diese Interaktion stattfindet und wie sie sich auswirkt.

In Folge der Fusion der beiden Membranen wird das Nucleocapsid mitsamt der RNA in die Wirtszelle aufgenommen. Elektronenmikroskopisch lassen sich nun Einschlusskörperchen von hoher Dichte, die das Nucleocapsid beinhalten, in der infizierten Zelle erkennen. Im nächsten Schritt erfolgt die Transkription der RNA mit Hilfe der RNase-Aktivität des L-Proteins unter Beteiligung der anderen Proteine des Nucleocapsids. Die Transkription beginnt am 3'-Ende der RNA im Bereich der *Leader*-Sequenz und endet zunächst vor Beginn des N-Gens. Die intergenischen Nukleotide werden übersprungen und die Synthese der mRNA für

das N-Gen beginnt am *S-Consensus*. Am *E-Consensus* des N-Gens stoppt die Transkription erneut. Nach Überspringen der folgenden intergenischen Nukleotide wird die Reaktion an der *S-Consensusregion* des P-Gens fortgesetzt. Diese Abfolge von Beginn der Transkription am *S-Consensus*, Ende am *E-Consensus* und Überspringen der intergenischen Nukleotide wiederholt sich für jedes Gen, sodass am Ende der Transkription 10 mRNA Moleküle gebildet worden sind. Das P-Protein scheint die Verbindung des 5'-Endes der mRNA mit *Cap*-Gruppen zu katalysieren. Die Uracilreste im Bereich des *E-Consensus* stellen vermutlich das Polyadenylierungssignal für das 3'-Ende dar (91).

Die Genexpression wird auf verschiedene Weise kontrolliert. In Transkriptionsrichtung bildet sich ein natürlicher Gradient aus, der dadurch entsteht, dass der Enzymkomplex nach Überspringen der intergenischen Nukleotide nicht immer wieder korrekt an das folgende Gen bindet. Daher wird von dem N-Protein, dessen Gen dem 3'-Ende, und damit dem *Promotor* des Genoms, am nächsten liegt, am meisten synthetisiert. Das am 5'-Ende liegende L-Gen weist die geringste Transkriptionsrate auf. Das M2-1-Protein könnte diesen Gradienten abschwächen, indem es die fortschreitende Transkription unterstützt (26,42,63,64). Ein weiterer natürlicher Regulationsmechanismus ist die Tatsache, dass die Abfolge Transkriptionsstop – Überspringen intergenischer Nukleotide – Transkriptionsstart nicht immer erfolgreich ist. Dies scheint allerdings unabhängig von den unterschiedlichen Sequenzen der intergenischen Regionen zu sein. Schließlich ist auch die Länge des Gens ein Faktor, der die Transkription beeinflusst. So ist die lange mRNA des L-Proteins nicht so stabil wie kürzere mRNAs der anderen Proteine.

Im Folgenden muss ein Übergang zwischen Transkription und Replikation der RNA erfolgen. Dazu scheint das M2-2-Protein erforderlich zu sein. Je höher die intrazelluläre Konzentration dieses Proteins, desto stärker wird die Transkription gehemmt und die Replikation gefördert (15). Voraussetzung für die Replikation ist die Synthese einer durchgängigen RNA in Positivstrangorientierung, welche als Matrize für die Bildung neuer RNA-Moleküle für die neu entstehenden Viruspartikel dient. Um ein vollständiges Genom zu generieren, müssen auch die intergenischen Nukleotide mit abgelesen werden.

Etwa 4 bis 6 Stunden nach der Infektion lässt sich mRNA in der Wirtszelle nachweisen. Der Höhepunkt der Proteinbiosynthese ist nach 18 bis 20 Stunden erreicht. Die ersten vollständigen Viruspartikel treten 8 bis 10 Stunden nach der Infektion auf (81). Zunächst werden die Oberflächenproteine F, G und SH in die Membran der Wirtszelle eingelagert. Durch eine Interaktion zwischen diesen Proteinen und dem M-Protein bildet sich die

Matrixschicht an der Innenseite der Membran aus. Das M-Protein tritt nun in Wechselwirkung mit den Proteinen des Nucleocapsids. Die Zellmembran stülpt sich nach außen und das Viruspartikel wird durch *Budding* freigesetzt (91). Bei polarisierten Zellen geschieht dies an der apikalen Zelloberfläche (114). Die Virusausscheidung kann bis zu drei Wochen anhalten.

1.2.5 RSV Subgruppen

Basierend auf Neutralisationstests mit polyklonalen Seren erkannte man im Jahr 1966, dass das Respiratorische Synzytialvirus eine erhebliche Variabilität in seiner Reaktion mit Antikörpern aufweist (25). Später wurden an Hand der Reaktion verschiedener Virusisolate mit monoklonalen Antikörpern die beiden Subgruppen A und B definiert (8,95). Diese unterscheiden sich besonders in der Sequenz der G- und SH-Proteine, wohingegen das F- und das N-Protein mit einem Anteil identischer Aminosäurefolge von 91% bzw. 96% gut konserviert sind. Weitere Untersuchungen, in denen neben Neutralisationstests auch molekulare Genotypisierungsmethoden wie z.B. *RNase A mismatch cleavage* Methode, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) sowie Sequenzierung des Genoms angewandt wurden, zeigten, dass es auch innerhalb der beiden Subgruppen eine Variabilität gibt, sodass eine weitere Unterteilung in verschiedene Genotypen erfolgte (19,21). Bisher gibt es jedoch keine einheitliche Nomenklatur. Mit Hilfe von monoklonalen, gegen das RSV-G-Protein gerichteten Antikörpern, die entweder an konservierte, an gruppenspezifische oder an subgruppenspezifische Epitope binden, können Wildisolate des Virus im *ELISA* charakterisiert werden. Die resultierenden Reaktionsmuster korrelieren mit den in der Sequenzierung bestimmten Genotypen (49,51,84).

Neben Punktmutationen treten Deletionen, Verschiebung des Leserahmens sowie neue Stoppcodons auf. Die Verschiebung des Leserahmens scheint *in vivo* nicht häufig vorzukommen. Sie betrifft besonders eine Adenosin-reiche Region des G-Proteins. Die Beobachtung, dass ein Austausch von Adenosin zu Guanodin gehäuft auftritt, legt die Vermutung nahe, dass auch *in vivo* das Phänomen der Hypermutationen auftritt (26,87).

Die Tatsache, dass RSV in zwei verschiedenen Subgruppen existiert, könnte eine Ursache für die hohe Rate an Reinfektionen darstellen. Während einer Epidemie ko-zirkulieren beide Subgruppen, wobei in der Regel eine Subgruppe, und zwar häufiger A als B, dominiert (48,67,68,152). Weiterhin wurde beobachtet, dass der Genotyp meist zwischen den einzelnen Epidemien wechselt. Möglicherweise entsteht ein Selektionsdruck dadurch, dass während einer Epidemie eine hohe Rate an Immunität gegen den zirkulierenden Genotyp entsteht (19,138). Zu bedenken ist jedoch auch die Möglichkeit, dass der Genotyp nur scheinbar

wechselt und eine Teilimmunität vor einem schweren Verlauf der Erkrankung schützt, sodass die Infektion nicht diagnostiziert und der Genotyp nicht bestimmt wird (19). In einigen Studien konnte ferner ein zyklisches Muster in der Abfolge der dominierenden RSV-Subgruppen in aufeinanderfolgenden Epidemien nachgewiesen werden (10,152).

Bis heute konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Schwere der Erkrankung und dem RSV-Genotyp gibt. So können Hinweise darauf, dass von RSV-A verursachte Bronchiolitiden mit einer höheren Hospitalisierungsrate und schwerwiegenderen klinischen Symptomen einhergehen als durch RSV-B hervorgerufene Erkrankungen, (103,141) nicht in allen Studien nachvollzogen werden (14,47,75,100).

1.2.6 Epidemiologie

Das Respiratorische Synzytialvirus ist einer der häufigsten Erreger von Atemwegsinfektionen weltweit. Jährliche Epidemien treten in der nördlichen Hemisphäre von November bis April auf, wobei die meisten Infektionen zwischen Februar und März registriert werden. Bis zum zweiten Lebensjahr sind Kinder zumindest einmal erkrankt. Die Erstinfektion erfolgt meist innerhalb der ersten neun Lebensmonate, zu einem Zeitpunkt, zu dem in der Regel noch mütterliche Antikörper (besonders IgG) im Blut des Kindes nachweisbar sind. In den USA werden jährlich mehr als 40.000 Säuglinge mit RSV-assoziiierter Pneumonie und mehr als 100.000 Kinder (jünger als 5 Jahre) mit durch RSV verursachter Bronchiolitis stationär eingewiesen (124). Damit ist RSV der häufigste Verursacher von schweren, stationär behandelten Atemwegsinfektionen. Doch auch erwachsene, insbesondere in Pflegeheimen lebende oder immunsupprimierte Personen erkranken in Folge von RSV-Infektionen (140).

Es gibt zahlreiche Risikofaktoren, die für die Infektion prädisponieren. Dazu gehören immunologische Faktoren wie Immunsuppression, Zustand nach Knochenmarkstransplantation, Frühgeburtlichkeit, kardiale oder pulmonale Vorerkrankungen wie kongenitale Herzerkrankungen, zystische Fibrose und besonders bronchopulmonale Dysplasie. Auch demographische Faktoren, beispielsweise niedriger sozioökonomischer Status, männliches Geschlecht, Säuglings- oder hohes Alter, Stillverzicht, Geburt während oder kurz vor der RSV-Epidemie und Passivrauchen, können eine Infektion und den Verlauf der Erkrankung beeinflussen (142).

Reinfektionen während des gesamten Lebens sind häufig und verlaufen zwar abgeschwächt, aber dennoch symptomatisch (65). Eine vollständige Immunität wird augenscheinlich nicht erworben. Während der RSV-Epidemie sind 25% bis 50% der Pflegekräfte pädiatrischer

Stationen mit dem Virus infiziert (59), (60), (26). Die Vermutung, dass nosokomiale Infektionen ein weiteres Problem darstellen, liegt daher nahe. Bis zu 47% der Kinder, die während der RSV-Epidemie aus anderen Gründen stationär aufgenommen werden, infizieren sich während des Krankenhausaufenthalts mit dem Virus (26).

Ein letaler Verlauf der Erkrankung ist selten, aber nicht ausgeschlossen. Schätzungsweise 0,3% bis 1% der hospitalisierten Kinder sterben im Verlauf der Infektion (26,92,98). Schwere Erkrankungsverläufe treten erst im hohen Alter wieder gehäuft auf (39,40).

1.2.7 Klinik und Pathogenese

Die Infektion mit dem Respiratorischen Synzytial Virus erfolgt in der Regel über die Konjunktiven und die Nasenschleimhaut. Nach einer Inkubationszeit von 4 bis 5 Tagen treten die ersten Symptome einer oberen Atemwegsinfektion mit leichter Temperaturerhöhung und Schnupfen auf. Das Virus wird vor allem in der obersten Zellschicht des respiratorischen Epithels repliziert, infiziert aber auch Makrophagen und Monozyten (26,36). Bei unzureichender Immunität breitet sich das Virus im unteren Respirationstrakt aus. Dies geschieht durch Aspiration des virushaltigen Sekrets und durch Fusionsbildung der infizierten Epithelzellen. Letzteres schützt das Virus vor der Immunreaktion des Körpers. Äußerte sich die Infektion zunächst vor allem in vermehrter Sekretbildung, Pharyngitis und Tracheitis, so können nun Symptome einer Bronchiolitis wie Giemen, Tachydyspnoe, Hypoxämie, ödematöse Schwellung der respiratorischen Schleimhaut, Überblähung der Lunge und Hyperreagibilität der glatten Muskulatur der Atemwege auftreten (142). Auch eine interstitielle Pneumonie kann sich entwickeln. In seltenen Fällen lässt sich das Virus in anderen Organen wie Leber, Niere und Myokard nachweisen (26,90).

Pathogenetisch ist die Zerstörung des respiratorischen Epithels und die darauf folgende Immunreaktion von großer Bedeutung. Ersteres geschieht durch Nekrosebildung und durch die Bildung von Synzytien. Das Bronchialepithel beginnt zu proliferieren. In der Folge bildet sich ein peribronchiales Infiltrat aus Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Es entwickelt sich ein Ödem der Schleimhaut. Im Lumen der Bronchien und Alveolen lässt sich ein Exsudat aus Schleim, abgelösten Epithelzellen und Zellen des Immunsystems nachweisen. Es kommt zur Obstruktion der Bronchioli und Alveolen mit nachfolgender Emphysem- oder Atelektasebildung. Entwickelt sich eine Pneumonie, so verdickt sich zusätzlich die Wand der Alveolen durch ein monozytäres Infiltrat (5,26).

In Proben, die durch bronchoalveoläre Lavage aus dem Respirationstrakt von mit RSV infizierten, beatmeten Kindern gewonnen wurden, ließ sich eine Abnahme der Konzentration der Surfactantproteine A, B und D erkennen. In vitro Versuche lassen vermuten, dass Surfactant A RSV neutralisieren kann, indem es an das F-Protein bindet (55,88).

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems scheint durch das RSV F-Protein über die sog. *Pattern-recognition Rezeptoren* CD14 und *Toll-like Rezeptor 4* (TLR4) vermittelt zu werden (79,88). Während der Infektion sind neutrophile Granulozyten im Respirationstrakt vorherrschend (38). Für die Chemotaxis dieser Zellen ist vermutlich das Chemokin IL-8, welches von infizierten respiratorischen Epithelzellen sezerniert wird, von großer Bedeutung. Die Genexpression des Chemokins verläuft wahrscheinlich biphasisch mit einem ersten, replikationsunabhängigen Anstieg etwa zwei Stunden nach der Infektion und einem zweiten Peak etwa 24 Stunden danach (46). Möglicherweise korreliert die IL-8 Konzentration im Nasopharynx mit der Schwere der Erkrankung (88,125). Neben IL-8 sezernieren die Epithelzellen auch IL-6, IL-1 β , MIP-1 α und RANTES (88). Diese wirken chemotaktisch, steigern die Gefäßpermeabilität, aktivieren Zellen des Immunsystems und induzieren die Synthese von Akut-Phase Proteinen in der Leber. Vermittelt durch IL-1 entwickelt sich Fieber.

Um zum infizierten Gewebe zu gelangen, müssen die neutrophilen Granulozyten die Blutbahn verlassen. Eine erste, schwache Bindung zwischen Granulozyten und Endothelzellen wird bei RSV-Infizierten vor allem durch L-Selektin vermittelt und ermöglicht das sog. „*Rolling*“ entlang der Gefäßwand. Die Interaktion zwischen ICAM-1 und den Rezeptoren LFA-1, VCAM-1 und Mac-1 ermöglichen den Durchtritt durch das Endothel. Indem die Granulozyten nun dem chemotaktischen Gradienten folgen, gelangen sie an den Ort der Infektion. Dort zerstören sie infizierte Zellen (88).

Neben den neutrophilen Granulozyten sind die Makrophagen während der Infektion von großer Bedeutung. Sie sezernieren wie die Epithelzellen Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und TNF- α) und aktivieren so Lymphozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), neutrophile und möglicherweise auch eosinophile Granulozyten (13,102). Die NK-Zellen sind schon in den ersten Tagen der Infektion in der Lunge nachweisbar und produzieren IFN- γ , aktiviert durch IL-12, TNF- α und IFN- β (70,88). Die eosinophilen Granulozyten synthetisieren vermutlich vermehrt ein kationisches Protein, welches zytotoxisch wirkt (26,54). Einen zytotoxischen Effekt haben auch die RSV-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten, deren Aktivierung einen Peak nach etwa einer Woche post infectionem zeigt (24,88).

Die dominierende Form der CD4⁺ T-Lymphozyten ist altersabhängig. Bei Neugeborenen und Kleinkindern ist die TH2-Immunantwort vorherrschend, wohingegen ältere Kinder und Erwachsene vermehrt TH1-Lymphozyten als Reaktion auf die RSV-Infektion bilden. Es ist nicht bekannt, welche Auswirkung dies auf den Verlauf der Erkrankung hat (9,26).

Schließlich scheinen auch RSV-spezifische Antikörper die Immunopathogenese der Infektion zu beeinflussen, denn die schwersten Verlaufsformen treten bei Kindern im Alter von zwei bis sechs Monaten auf, ein Zeitpunkt, zu dem im Blut noch mütterliche, neutralisierende Antikörper nachweisbar sind. Die potentesten neutralisierenden Antikörper sind solche, die gegen das F- oder G-Protein des Respiratorischen Synzytial Virus gerichtet sind (32). In den ersten Tagen der Infektion dominieren IgM-Antikörper. Sie sind für ein bis zwei Wochen nachweisbar. Die Synthese der IgG Antikörper zeigt einen *Peak* nach vier Wochen und hält für ein bis zwei Monate an. In den Atemwegen lassen sich nach der Infektion auch sezernierte Antikörper der Klassen IgA und IgG nachweisen. Die Bedeutung von IgE ist noch immer ungeklärt. Obwohl die Antikörper die Zerstörung von infizierten Zellen beeinflussen können, indem sie das Komplementsystem und Granulozyten aktivieren, scheint ihr protektiver Effekt zu dominieren. Dies wird beispielsweise durch die Untersuchung von Nabelschnurblut nahegelegt, die eine Korrelation zwischen RSV Antikörper Titer und Schwere der Erkrankung zeigte (26).

1.2.8 Therapie und Prophylaxe

Bis heute ist es nicht gelungen, eine effektive kausale Therapie einer RSV-Infektion zu entwickeln. Der Linderung der Symptome dienen unterstützende Maßnahmen wie Absaugen des Sekrets, Sauerstoffgabe und Lagerung des Erkrankten. Bei schwersten Fällen kann eine mechanische Beatmung erforderlich sein. Die Substitution von Bronchodilatoren und Kortikosteroiden ist umstritten und die Wirksamkeit nicht belegt (117,118). Seit 1986 ist das antiviral wirkende Ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamid; Virazol) erhältlich. Der Wirkmechanismus dieses Medikaments ist nicht bekannt. Es wird als Aerosol in der Regel für drei bis sieben Tage verabreicht (117,142). Obwohl sich die klinischen Symptome und die Verbreitung des Virus unter der Therapie mit Ribavirin bessern, konnte nicht nachgewiesen werden, dass es die Mortalität, stationäre Liegedauer und das Angewiesensein auf unterstützende Maßnahmen senkt (89,111,112). Topisch verabreichte Interferone und Vitamin A zeigten keine Wirkung (17,69).

Der Prophylaxe einer schweren RSV-Infektion dienen zwei Antikörperpräparate, die während der RSV-Saison monatlich verabreicht werden müssen. Das Präparat RespiGam bzw. RSV-

IGIV enthält polyklonale humane IgGs und wird intravenös für vier bis fünf Monate verabreicht. In Deutschland fehlt die Zulassung für das Medikament. Wie im Fall von Ribavirin konnte auch für RespiGam keine Reduktion der Mortalität nachgewiesen werden. Signifikant ist allerdings die Senkung der Hospitalisierungsrate, der Dauer des Krankenhausaufenthalts und der Notwendigkeit der Intensivpflege. Ähnliche Ergebnisse erzielte der in Deutschland zugelassene monoklonale humanisierte murine Antikörper Synagis[®] bzw. Palivizumab, der gegen das RSV-F-Protein gerichtet ist. Er wird einmal monatlich intramuskulär injiziert. Beide Antikörperpräparate werden wegen der hohen Therapiekosten nur für Kinder mit hohem Risiko eines schweren Erkrankungsverlaufs, besonders für Frühgeborene mit noch nicht abgeschlossener Lungenreife, empfohlen (2,142).

Zahlreiche Faktoren erschweren die Entwicklung eines kompetenten Impfstoffes. Dieser müsste gegen die beiden Subgruppen A und B zugleich schützen, die jedoch nur eine antigene Übereinstimmung von etwa 25% aufweisen. Ein weiteres Problem ist, dass die Impfung im ersten Lebensmonat erfolgen müsste, da schwere Erkrankungsverläufe vor allem in den ersten sieben Monaten auftreten. Zu diesem Zeitpunkt ist das Immunsystem des Säuglings noch nicht ausgereift. Eine effektive Immunantwort wird außerdem durch die im Blut vorhandenen mütterlichen RSV-spezifischen Antikörper verhindert. Vermutlich müssten mehrere Impfdosen verabreicht werden, um eine komplette Immunität zu erzielen. Eine Impfung müsste auch ältere, seropositive Risikopersonen vor einer Reinfektion schützen. Bisher ist es nicht gelungen, einen Impfstoff zu entwickeln, der beide Zielgruppen gleichermaßen schützen könnte. Erschwerend kommt hinzu, dass es kein ideales Tiermodell für die vorklinische Prüfung gibt (142).

Mitte der 1960er Jahre wurde ein Totimpfstoff entwickelt, der Formalin-inaktiviertes Virus enthielt. Entgegen der Erwartung verschlimmerte er jedoch die Erkrankung, sodass die Hospitalisierungsrate im Vergleich zu nicht Geimpften deutlich anstieg und zwei der geimpften Kinder im Verlauf der Infektion verstarben. Inzwischen gibt es für dieses Ergebnis einige Erklärungsansätze: Der parenteral verabreichte Impfstoff konnte wahrscheinlich keine ausreichende lokale Immunität im Respirationstrakt erzeugen. Die geimpften Kinder entwickelten einen hohen Titer an Antikörpern, die gegen das RSV-F-Protein gerichtet waren, jedoch eine nur unzureichende Virus-neutralisierende Aktivität aufwiesen. Möglicherweise wurden durch den Prozess der Formalin-Inaktivierung wichtige protektive Epitope des Proteins denaturiert. Die Ergebnisse einer Studie, in der der Impfstoff an Mäusen und Ratten getestet wurde, legen nahe, dass durch die Impfung zwar CD4⁺ T-Lymphozyten in hohem

Maße aktiviert wurden, nicht jedoch CD8⁺ T-Lymphozyten, welche essentiell für die Immunantwort sind (26,128,142).

Subunit-Impfstoffe enthalten gereinigte RSV-F- und G-Proteine. Sie könnten bei seropositiven Risikopatienten und schwangeren Frauen zum Einsatz kommen. Zur Prophylaxe bei RSV-naiven Säuglingen sind auch sie nicht geeignet, da einige Studien darauf hindeuten, dass die *Subunit*-Impfstoffe wie der Totimpfstoff eine Verschlimmerung des Erkrankungsverlaufs verursachen könnten (96). Außerdem können sie keine adäquate CD8⁺ T-Lymphozyten-Aktivierung erzeugen, da sie nicht replikationsfähig sind. Da sie ebenfalls parenteral verabreicht werden müssen, ist der lokale Schutz im Respirationstrakt begrenzt (26,142).

Ein weiterer Ansatz der Impfstoffentwicklung ist die Gewinnung rekombinanter, infektiöser Virusisolate aus cDNA. Auf diese Weise könnten gezielt Mutationen erzeugt werden. Andere Strategien beinhalten DNA-Vakzine und rekombinante Vaccinia- bzw. Vesicular-stomatitis-Virus-Isolate.

Der Einsatz attenuierter RSV-Lebendmutanten zur Prophylaxe der Virusinfektion erscheint vielversprechender. Sie können intranasal verabreicht werden und imitieren so die natürliche Infektion. Auch lässt sich durch diese Art der Applikation eine bessere lokale Immunantwort erzeugen als bei der parenteralen Gabe eines Impfstoffes. Das attenuierte Virus kann sich auch in Gegenwart mütterlicher Antikörper replizieren. Problematisch sind jedoch die genetische Instabilität des Impfstoffkandidaten und der Grad der Attenuierung. So waren die zunächst getesteten sog. ts-Mutanten (temperatursensitiv) nur unzureichend attenuiert und verursachten bei seronegativen Säuglingen Rhinorrhö (110,146). Erfolgsversprechender ist die Kombination aus ts- und cp-Mutationen. Letztere entstehen durch mehrfache Passagen des Virus in Zellkulturen bei niedriger Temperatur. Durch die Kombination der beiden Mutationen entsteht ein stabiles, ausreichend attenuiertes Virus (34). Eine Mutante dieser Art, genannt cpts-248/404, wurde in einer randomisierten, plazebokontrollierten, doppelblind geführten klinischen Studie der Phase-I getestet und ist möglicherweise zur Infektionsprophylaxe bei RSV-naiven Säuglingen geeignet (142), (26), (146).

1.3 Fragestellung

Das Respiratorische Synzytialvirus lässt sich bei einer Vielzahl der an einer Infektion der oberen Atemwege leidenden Patienten als Erreger nachweisen. Vor allem Säuglinge bzw. Kleinkinder und ältere Menschen werden häufig infiziert. Diese Patientengruppen sind besonders anfällig für Komplikationen wie die Entwicklung einer Bronchiolitis oder einer interstitiellen Pneumonie. Augenscheinlich erlangen die Erkrankten nach der Infektion keine vollständige Immunität, sodass Reinfektionen auftreten. Diese verlaufen zwar milder als die Erstinfektion, sind aber meist symptomatisch. Bis heute ist die Ursache der fehlenden Entwicklung einer Immunität nicht befriedigend geklärt.

Eine weitere Schwierigkeit stellen Therapie und Prophylaxe der Infektion dar. Bisherige therapeutische Ansätze helfen zwar, die Symptome zu lindern und die Hospitalisierungsrate zu senken, die Mortalitätsrate bleibt hingegen unbeeinflusst. Ebenso verlief die Entwicklung eines Impfstoffes bislang erfolglos. Ein Grund hierfür ist die genetische Variabilität des Virus. Neben den beiden Hauptgruppen RSV A und B gibt es verschiedene Genotypen. Ein Impfstoff müsste vor einer Infektion aller Subgruppen schützen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher, die genetische und antigenetische Variation von RSV-Wildisolaten der Jahre 1996 bis 2008 zu untersuchen und zu prüfen, ob systematische Mutationen im Sinne eines Antigen drifts, wie er bei Influenzaviren bekannt ist, erkennbar sind. Dafür wurden 18 Virusisolate der Subgruppe A und 5 der Subgruppe B, die aus Proben von erkrankten Kindern in Düsseldorf isoliert wurden, ausgewählt. Mit Hilfe der Sequenzierung der Gene des F- und G-Proteins sollte ein Stammbaum erstellt werden. Ferner sollten die Isolate mit 11 anti-G- und 3 anti-F-monoklonalen Antikörpern, die gegen den RSV-A-Strain Mon/3/88 und gegen den RSV Long strain produziert wurden, im *ELISA* und Neutralisationsassay getestet werden. Als Nebenaspekt der Arbeit sollte die Wirksamkeit des monoklonalen humanisierten murinen Antikörpers Synagis[®], welcher in der Prophylaxe der RSV-Infektion eingesetzt wird, im Neutralisationstest mit den RSV-Wildisolaten überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Isolierung von RSV in der Zellkultur

Zellen: HEp2: humane Larynx-Carcinom-Zelllinie

RSV-Isolate: anonymisierte Patientenisolat der Jahre 1996 bis 2008 (virushaltige Zellkulturüberstand aus früherer Anzucht, Lagerung: -80°C); die Zuordnung zu den Subgruppen A und B erfolgte mit Hilfe der quantitativen *Real-time PCR* (s. 2.4.3)

RSV A: 5138/1996, 3224/2000, 4615/2000, 4803/2001, 4849/2001, 7497/2001, 2363/2003, 3287/2003, 3318/2004, 31867/2004, 2589/2005, 6122/2005, 33406/2006, 38309/2006, 40911/2006, 10615/2007, 12076/2008, 12653/2008

RSV B: 3027/1999, 211/2002, 3368/2004, 1365/2007, 4617/2007

Zellkulturmaterialien:

DMEM (GIBCO, REF 41966-029)

Foetal Bovine Serum (GIBCO, REF 10270-106)

DPBS (GIBCO, REF 14190-094)

0,5% Trypsin-EDTA (GIBCO, REF 25300-054)

Penicillin-Streptomycin (GIBCO, Cat. No. 15140-122)

Erhaltungsmedium: *DMEM* mit 1% Penicillin, Streptomycin und 2% *FCS*

Wachstumsmedium: *DMEM* mit 1% Penicillin, Streptomycin und 10% *FCS*

Sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) (Serva, Cat. No. 355.79.02)

HEp2 Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. War der Zellrasen zu 30-50% konfluent, so wurde das Medium dekantiert und Zellkulturüberstand eines RSV-Isolats hinzugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Anschließend wurde das Inokulum entfernt und Erhaltungsmedium hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 34°C und 5% CO₂-Gehalt. Nach drei bis fünf Tagen wurden Passagen oder Kokultivierungen durchgeführt.

Gewinnung von Virusaliquots

Zur Gewinnung der *Virusaliquots* wurden die infizierten Zellen durch Aufschütteln vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und die entstandene Zellsuspension samt Zellkulturüberstand in ein Falconröhrchen überführt. Nach Zugabe von 10% Sucrose wurden die *Aliquots* bei -80°C gelagert.

2.2 Extraktion der RNA

2.2.1 Prinzip

Die Extraktion der RNA erfolgte mit Hilfe der *Bio Robot EZ1 Workstation* der Firma Qiagen (No. 9000705). Durch Proteinase K werden Zellen und die darin enthaltenen viralen Partikel lysiert und RNAsen inaktiviert. Es folgen mehrere Waschstschritte zur Aufreinigung der RNA auf dem Prinzip der Guanidin-Thiocyanat-Extraktion, welche schließlich, nach Zugabe von Isopropanol, an magnetische Silikapartikel bindet.

2.2.2 Reagenzien

EZ1 Virus Mini-Kit (48) v2.0 Cat.No. 955134:

Reagenzien-Kassetten

Filter-Tips

Sample tubes, 2ml

Elution tubes, 1,5ml

Carrier RNA

AVE-Puffer

Die Carrier-RNA (310 μg) wurde in 5ml AVE-Puffer gelöst und in 50 μl Portionen bei 4°C gelagert.

Probe:

200 μl Zellkulturüberstand

2.3 Reverse Transkription

Der *Master-Mix* wurde mit Reagenzien der Firma Invitrogen angesetzt.

	µl für 1x Ansatz	Konz.
5x First Strand Buffer (Part No. Y00146)	4.0	
0,1 M DTT (Part No. Y00147)	2.0	20 nM
dNTP – Mix 10µM (Roche, Cat No. 11 581 295 001)	1.0	1µM
Primer F (5µM)	3.0	1,5 µM
Super Script II (Cat No. 18064-014)	0.2	
Gesamt	10.2	

In jedes *Cup* wurden jeweils 10 µl *Master-Mix* und 10 µl Probe pipettiert. Letztere wurde zuvor 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler Perkin Elmer 9600. Die gewonnenen Produkte wurden sofort weiter verwendet oder bei –20°C gelagert.

Protokoll:

Hold at 45°C 60 Min
 Hold at 70°C 15 Min
 Hold at 4°C Forever

2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.4.1 Konventionelle PCR

2.4.1.1 *Primer:*

Die Auswahl der *Primer* erfolgte mit Hilfe des Programms “Primer Express” der Firma Applied Biosystems.

F-Protein RSV Subtyp A:

Sense-Primer: RSV-F-F2; $T_m=58,4^\circ\text{C}$
 5’–ATA ACA ATG GA(GT) TTG CCA ATC CTC-3’

Anti-sense-Primer: RSV-F-R2; $T_m=58,9^\circ\text{C}$
 5’–GAA CAT GAT TAG GTG CTA TTT TTA TT(CT) AG-3’

F-Protein RSV Subtyp B:

Sense-Primer: RSV-B-F-F1; $T_m=49^\circ\text{C}$
5'-ACC ATG GAG TTG CTG ATC C-3'

Anti-sense-Primer: RSV-B-F-R1; $T_m=52^\circ\text{C}$
5'-TTT GTC TAT TTG CTG AAT GCA ATA-3'

G-Protein:

Sense-Primer: RSV-G-F1; $T_m=59,8^\circ\text{C}$
5'-GGG GCA AAT GCA AAC ATG TC-3'

Anti-sense-Primer: RSV-G-R1; $T_m=59,3^\circ\text{C}$
5'-GAG GAT TGG CAA CTC CAT TGT TAT-3'

Alle *Primer* wurden auf eine Endkonzentration von 5 μM durch Verdünnung mit *Minimal TE* eingestellt.

Minimal TE (1mM Tris-HCl pH 8 / 0,01 mM EDTA):

1 M Tris-HCl pH 8 50 μl

0,5 M EDTA 1 μl

aqua dest. ad 50 ml

2.4.1.2 Master-Mix Ansatz

	μl für einfach Ansatz	Konzentration
10x Puffer	5.0	1x
Pwo DNA-Polymerase (Roche, Ref.: 11 644 955 001)	0.5	2,5 units
Primer F (5 μM)	2.5	250nM
Primer R (5 μM)	2.5	250nM
dNTP-Mix (10 μM)	2.0	0,5 μMol
Aqua dest.	32	
Gesamt	44.5	

Volumen der Probenzugabe: 5 μl

Negativ-Kontrolle: Aqua dest.

Positiv Kontrolle: RSV Long Strain

Da die PCR-Produkte zur Sequenzierung genutzt werden sollten, wurde die Pwo-Polymerase verwendet. Diese hat eine sog. „*proove reading*“ Funktion, wodurch die Fehlerquote bei der Replikation sehr gering ist.

2.4.1.3 Amplifikationsparameter

Thermocycler Perkin Elmer 9600

Hold at 95°C	15 Min	} 40 Zyklen
Hold at 94°C	1 Min	
Hold at 55°C	1 Min	
Hold at 72°C	2 Min	
Hold at 4°C	Forever	

2.4.1.4 Gelelektrophorese

Eine 1%-ige Agaroselösung von Biozym DNA Agarose (REF 870.055) in TBE-Puffer (10,8g Tris base, 5,5g Borsäure, 4ml 0,5M EDTA auf 1l Aqua dest.) wurde hergestellt und im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis sich die Agarose löste. Nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zu 50 ml Agarose-Lösung wurde der Ansatz in eine Gelkammer mit hineingestecktem Kamm gegossen und bei 4°C ausgehärtet. Währenddessen wurden 10µl der Probe mit 2µl 6x - Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylenecyanol, 30% Glycerol 100% in aqua dest.) gemischt. Nach Aushärtung des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel mit TBE-Puffer bedeckt und jeweils 10 µl der Probe in die Taschen aufgetragen. In die erste Tasche wurden 10 µl einer KB-Leiter (GIBCO, One-Kb-Ladder, Best. Nr.: 15615-024) als Größenstandard gegeben. Der Wert der angelegten Spannung betrug 40-70 mV. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die unterste Bande das untere Drittel des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde dann unter UV-Licht betrachtet. Die Dokumentation erfolgte mit dem Lumi-Imager F1 der Firma Roche und dem Programm LumiAnalyst 3.1. Das Gel wurde 0,02 ms mit 600 nm belichtet.

2.4.2 Nested-PCR

Das Prinzip der *Nested-PCR* wurde angewandt, wenn das Signal des PCR-Produktes in der Gelelektrophorese zu schwach war. Ziel der *Nested-PCR* ist, durch erneute Amplifikation eines PCR-Produktes die Menge an Amplifikaten zu erhöhen, sodass man auch geringe Mengen an *Templates* nachweisen kann. Es wurde derselbe *Master-Mix* verwendet, wie bei der konventionellen PCR, nur die *Primer* wurden ausgetauscht. Da sich die *Primer* der *Nested-PCR* weiter innenliegend an das Amplifikat anlagern als die der vorangegangenen

PCR, wird das neu entstehende Produkt kürzer als das vorherige. Fehlerhafte Amplifikate werden nicht erneut repliziert. Als Probe für die *Nested-PCR* diente das PCR-Produkt des vorherigen Ansatzes. Die Amplifikationsparameter wurden nicht verändert.

2.4.2.1 *Primer*

Sense-Primer: RSV-F-F3; $T_m=57,6^\circ\text{C}$
5'-AGC AAA TGC AAT TAC CAC (AT)AT CCT-3'

Anti-sense-Primer: RSV-F-R3; $T_m=59,7^\circ\text{C}$
5'-TTA TAC CAC TCA GTT GAT CCT T(AG)C TTA-3'

2.4.3 Real-time-PCR

2.4.3.1 *Prinzip*

Das Prinzip der quantitativen *Real-time-PCR* wurde angewandt, um den Gehalt an Virus-RNA im Zellkulturüberstand beurteilen zu können. Bei der *Real-time-PCR* wird dem Reaktionsgemisch eine Sonde hinzugefügt, welche am 5' Ende mit einem Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff (6-Carboxy-Fluorescein, FAM) und am 3' Ende mit einem *Quencher*-Farbstoff markiert ist. Die zu der Matrize komplementäre Sonde hybridisiert in der *Annealingphase* an die zu amplifizierende DNA und wird in der *Extensionsphase* von der Taq-Polymerase verdrängt. Durch die dabei stattfindende Hydrolyse kommt es zu einer räumlichen Trennung zwischen *Reporter* und *Quencher*, welche ein mit Hilfe einer CCD-Kamera messbares Signal erzeugt. Die Auswertung erfolgt an Hand der Kinetik des Signalanstiegs. Diese ist abhängig von der Menge an Matrize zu Beginn der Amplifikation.

2.4.3.2 *Materialien und Durchführung*

Primer:

RSV Subtyp A:

Sense-primer: RSV-F1
TCT TAA ATC TRT AGC ACA AAT CAC ATT ATC

Anti-sense-primer: RSV-R1
TGA TGG CTG CAA TTA TAA GTG AAG TT

RSV Subtyp B:

Sense-Primer: RSV-F2
TTT AAA ATC TAT AGC ACA AAT AGC ACT ATC

Anti-sense-Primer: RSV-R2
TTA TGG CTG CAA TTA TGA GAG AGG TT

TaqMan PCR Sonde: RSV-MGB:

FAM-TGG CAA TGA TAA TCT C-MGB

Master-Mix:

	µl für 1x Ansatz	Konz.
2x QuantitectMM	12,5	1 x
Primer F (10 µM)	0,5	200 nM
Primer R (10 µM)	0,5	200 nM
Sonde (10 µM)	0,5	200 nM
Multiplex RT-Mix	0,25	
Aqua dest.	8,25	
Gesamt	22,5	

Volumen der Probenzugabe: 2,5µl

Negativ-Kontrolle: Aqua dest.

Positiv-Kontrolle: Long Strain

Amplifikationsparameter:

Hold at 50°C	20 Min	} 45 Zyklen
Hold at 95°C	15 Min	
Hold at 94°C	45 Sek	
Hold at 60°C	75 Sek	

Thermocycler Abbott m2000rt

Mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* sollte beurteilt werden, wie sich der Gehalt an Virus-RNA in der Zellkultur im zeitlichen Verlauf ändert. Zu diesem Zweck wurden an aufeinanderfolgenden Tagen Proben in Form von frischem Zellkulturüberstand aus mit RSV infizierten Kulturen entnommen, wobei die erste Probe gewonnen wurde, sobald mikroskopisch ein CPE erkennbar war. Die Extraktion der RNA erfolgte wie in 2.2

beschrieben. Die Produkte der Extraktion wurden bei -20°C gelagert oder am selben Tag in der PCR verwendet. In der PCR wurden Proben desselben Virusisolats von verschiedenen Entnahmetagen miteinander verglichen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ABI Sequence Detection Software Version 1.2.3.

2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

2.5.1 Materialien

Qiaquick PCR Purification Kit Katalog-Nr.: 28106 (Firma Qiagen)

Enthält:

Qiaquick Spin Columns

Puffer PBI

Puffer PE (Konzentrat)

Puffer EB

Collection tubes (2ml)

Loading Dye

Ethanol absolut (Merck, Bestell-Nr. 1.00983.1011, 1l)

2.5.2 Prinzip

Für die auf die konventionelle PCR folgende Sequenzierreaktion muss das PCR-Produkt aufgereinigt werden. Die im PCR-Produkt enthaltene DNA bindet bei einem pH-Wert von unter 7,5 und einem hohen Salzgehalt an eine in der Qiagen-Säule enthaltene Silica-Membran. Durch mehrere Waschstschritte und Zentrifugation werden Kontaminationen, die nicht an die Membran binden können, entfernt. Mit Hilfe des Elutionspuffers wird die aufgereinigte DNA schließlich von der Membran gelöst und in einem Eppendorf-Röhrchen aufgefangen.

2.5.3 Durchführung

In einem Eppendorf-Röhrchen wurden 5 Volumenanteile Puffer PBI (pH 5,0) mit 1 Volumenanteil der PCR-Probe gemischt und auf eine Qiaquick-Säule pipettiert. Die Säule wurde in ein *Collection Tube* gesetzt und eine Minute bei $10000 \times g$ zentrifugiert. Die durchgeflossene Flüssigkeit wurde verworfen. Zu den 55ml Puffer PE wurden 220 ml 96-

100%iges Ethanol pipettiert. Von diesem Ansatz wurden 750µl auf die Qiaquick-Säule gegeben. Es folgte eine Zentrifugation von einer Minute bei 10000 x g. Die im *Collection-Tube* aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule wurde erneut eine Minute zentrifugiert. Das *Collection-Tube* wurde nun mit der enthaltenen Restflüssigkeit verworfen und die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt. Es wurden 30µl Puffer EB auf die Säule pipettiert. Nach einer Minute folgte eine weitere Zentrifugation der Säule im Eppendorf-Gefäß bei 10000 x g, bei der das aufgereinigte PCR-Produkt im Eppendorf-Röhrchen aufgefangen wurde. Die gewonnenen Proben wurden sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

2.6 Sequenzierung

2.6.1 Prinzip

Die Sequenzierung erfolgte nach einer modifizierten Sanger Methodik („Dideoxysequenzierung“) mit Hilfe des ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer. Bei der Kettenabbruchsequenzierung wird der zu einer einzelsträngigen DNA komplementäre Strang synthetisiert. Neben den dafür notwendigen dNTPs enthält das Reaktionsgemisch auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs, denen die OH-Gruppe am 3'-C Atom der Ribose fehlt. Letztere werden sequenzspezifisch anstelle der dNTPs in den neu synthetisierten DNA Strang eingefügt. Auf Grund der fehlenden funktionellen Gruppe kann der Strang nicht verlängert werden. Durch diesen Kettenabbruch entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die nun in einer Kapillar-Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Ein Laser regt die Farbstoffe, mit denen die ddNTPs markiert sind, zur Fluoreszenz an, deren Strahlung von einem Detektor erfasst und in elektrische Signale umgewandelt wird. Durch das entstehende Muster lässt sich die zu Grunde liegende Sequenz entschlüsseln. Das *Alignment* der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms SeqScape, Version 2.5, Applied Biosystems und Clustal W (135). Zur Erstellung der Stammbäume wurde das Programm MEGA4 verwendet (130). Es wurden die sog. *Neighbor-Joining*- (119), die *bootstrap* Methode (1000 Replikate) (45) und das *Maximum Composite Likelihood Estimate* Verfahren (131) eingesetzt.

2.6.2 Auswertung

Eine Aminosäure wird durch ein Nukleotidtriplett kodiert. Dabei haben die Aminosäuren unterschiedliche Kodierungsmöglichkeiten, das heißt, für einige Aminosäuren gibt es mehrere

verschiedene Triplets, durch die sie kodiert werden. Man unterscheidet einfach- von mehrfach-degenerierten Orten. Bei einem einfach-degenerierten Ort führt die Mutation des Nukleotids an dieser Position zum Austausch der durch das entsprechende Triplet kodierten Aminosäure. Im Gegensatz dazu führt die Mutation an einem mehrfach-degenerierten Ort nicht zwangsläufig auch zum Aminosäureaustausch. Die häufigsten Mutationen finden sich an dritter Position im Basentriplett, gefolgt von Mutationen an erster Position. Diese Substitutionen bewirken meist keine Aminosäurenmutation oder erhalten zumindest den Charakter (hydrophob bzw. hydrophil; positiv bzw. negativ geladen) der kodierten Aminosäure, sodass sie auch als „konservative Substitution“ bezeichnet werden. Eine Mutation an zweiter Position des Basentriplets führt hingegen meist zum Tausch der Aminosäure gegen eine Aminosäure mit einem anderen Charakter und wird daher als „Radikalsubstitution“ bezeichnet (4). Bleibt die Aminosäure trotz einer Nukleotidsubstitution unverändert, so spricht man von einer stummen Mutation oder auch synonymen Substitution.

Die Berechnung der Nukleotid- und Aminosäuredivergenz diente der Analyse des Verhältnisses von stummen zu nicht-stummen Mutationen. Mit Hilfe des Programms MEGA4 wurde die Gesamtrate der Nukleotid- (ND) und Aminosäuredivergenzen (AAD) ausgerechnet und der Quotient ND/AAD berechnet. Dabei bedeutet ein Quotient ND/AAD <1, dass ein hoher Druck hin zu Änderungen auf Proteinebene besteht und kann als Hinweis auf das Vorliegen eines immunologischen Druckes, welcher in erster Linie durch Antikörper bedingt ist, gewertet werden.

Zur Analyse der synonymen- und nichtsynonymen Mutationen wurden die Nei-Gojobori-Methode (99) sowie das Programm SNAP („Synonymous/Nonsynonymous Analysis Program“) (3) verwendet. Dabei kommt ein anderer Algorithmus als der im vorherigen Abschnitt beschriebene zur Anwendung: Es werden die Nukleotidsubstitutionsraten pro Ort berechnet und dabei berücksichtigt, ob es sich um einen einfach- oder einen mehrfach-degenerierten Ort handelt.

Außerdem erfolgte die Berechnung des Transition/Transversion bias. Bei einer Transition liegt die Substitution einer Purin- gegen eine Purinbase bzw. einer Pyrimidin- gegen eine Pyrimidinbase vor. Bei einer Transversion kommt es hingegen zur Substitution einer Purin- gegen eine Pyrimidinbase oder umgekehrt. Transitionen sind häufiger als Transversionen und setzen einen einfachen Reaktionsschritt, die Desaminierung, voraus, wohingegen die Transversion eine Depurinierung erfordert.

Zur Beurteilung der potentiellen N- und O-Glykosylierungssequenzen kam die NetOglyc Software, Version 3.1, zum Einsatz (62). Für eine N-glykosidische Bindung ist die Aminosäurefolge Asparagin-X-Threonin/Serin erforderlich, wobei X nicht Prolin sein darf (113). Potentielle ausgedehnte O-glykosidische Bindungsstellen sind durch die Aminosäurefolge Lysin-Prolin-X_n-Threonin-Threonin-Lysin-X_n gekennzeichnet (113,116) (siehe auch 1.2.2.2 und 3.3). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

2.6.3 Material und Methoden

2.6.3.1 Master-Mix Ansatz

Primer:

Zusätzlich zu den in der konventionellen- und *Nested-PCR* verwendeten wurden für die Sequenzierung folgende *Primer* eingesetzt:

F-Protein RSV Subtyp A:

Sense-primer: RSV-F480; T_m= 58,1°C
5'-CTG CAC CTA GAA GG(AG) GAA GTG AA-3'

RSV-F895; T_m= 59,9°C
5'-GGA AGT CTT AGC ATA TGT AGT ACA ATT ACC ACT-3'

RSV-A-F265F; T_m= 57,6°C
5'-AAA TAT AAA AAT GCT GTA ACA GAA TTG CAT T-3'

RSV-A-F667F; T_m= 61,6°C
5'-ACT GTG ATA GAA TTC CAA CAA AAG AAC AAC A-3'

RSV-A-F1033F; T_m= 62,7°C
5'-GGT ACT GTG ACA ATG CAG GAT CAG-3'

Anti-sense-primer: RSV-R895; T_m= 64,5°C
5'-AGT GGT AAT TGT TCT ACA TAT GCT AAG ACT TCC-3'

RSV-A-F1057R; T_m= 62,7°C
5'-CTG ATC CTG CAT TGT CAC AGT ACC-3'

F-Protein RSV Subtyp B:

Sense-primer: RSV-B-F470; $T_m = 60^\circ\text{C}$

5'-CTA CAC CTT GAA GGA GAA GTG AAC AAA-3'

RSV-B-F885; $T_m = 60,3^\circ\text{C}$

5'-AGA AGT CCT TGC ATA TGT TGT ACA GCT AC-3'

Anti-sense-primer: RSV-B-R885; $T_m = 63,9^\circ\text{C}$

5'-GTA GCT GTA CAA CAT ATG CAA GGA CTT CT-3'

G-Protein RSV Subtyp B:

Sense-primer: RSV-B-G-F01; $T_m = 51,7^\circ\text{C}$

5'-GGG GCA AAT GCA ACC-3'

RSV-B-G-F257; $T_m = 58,9^\circ\text{C}$

5'-ACC ACA CTG AGA AAA ACA TCA CC-3'

RSV-B-G-F480; $T_m = 54,2^\circ\text{C}$

5'-CCA AAA AAA CCA AAA GAT GAT TAC-3'

Anti-sense-primer: RSV-B-G-R-560; $T_m = 56,5^\circ\text{C}$

5'-GGA TTT GCA GAG TTG ATT GTT G-3'

RSV-B-G-R-870; $T_m = 59,4^\circ\text{C}$

5'-GAG TGG AGG GAT TGC TGT TG-3'

	μl für 1x Ansatz	Konz.
Primer (5 μM)	0.5	0,5 μMol
5x BigDye Sequencing Buffer (Applied Biosystems Part No. 4336697)	1	
HPLC-H ₂ O	5.5	
Gesamtvolumen	7	

In jedes *well* wurden 7 μl des *Master-Mixes* pipettiert. Dann wurden 2 μl Termination Ready Reaction Mix v1.1 (Part No. 4336768) zu jedem Ansatz hinzugegeben und gemischt.

2.6.3.2 Ansatz für Standard pGEM

	μl	Konz.
M13(-21)Primer (Applied Biosystems Part No. 360364)	2	0,5 pmol/ μl
5x BigDye Sequencing Buffer	1	
Gesamtvolumen	3	

Der Ansatz wurde in das letzte *Well* pipettiert und mit 2 μl Termination Ready Reaction Mix gemischt. Für den Standard wurden 9 μl HPLC freies H_2O zu 1 μl pGEM gegeben. Von diesem Gemisch wurden 5 μl zum Ansatz hinzugegeben.

Unter der Sicherheitswerkbank wurde jeweils 1 μl des aufgereinigten PCR-Produktes zum *Master-Mix* Ansatz gegeben. Die *Cycle Sequencing* Reaktion erfolgte im Thermocycler Perkin Elmer 9600.

2.6.3.3 Protokoll

Hold at 96°C	1 Min	} 25 Zyklen
Hold at 96°C	10 Sek	
Hold at 58°C	5 Sek	
Hold at 60°C	4 Min	
Hold at 4°C	Forever	

2.7 Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Reagenzien:

SigmaSpin Post-Reaction Purification Columns (Sigma, product code: S 5059)

Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, PN 4311320)

Durchführung:

Die Deckel der Sigma Spin Columns wurden halb aufgeschraubt und der untere Verschluss abgebrochen. Die Säulen wurden nun in ein *Collection Tube* gestellt und zwei Minuten bei

750g zentrifugiert. Die *Collection Tubes* wurden mit der abzentrifugierten Flüssigkeit verworfen und die Säulen in neue Auffanggefäße gestellt. Jeweils 10 µl der Probe wurden in die Mitte einer Säule pipettiert. Es folgte die Zentrifugation für 4 Minuten bei 750g. Nun wurden die Säulen verworfen und die *Collection Tubes* offen für 30 bis 50 Minuten in der Sped Vac Zentrifuge bei mittlerer Wärmestufe zentrifugiert. Sobald die Flüssigkeit vollständig verdampft war, wurde das *Pellet* in 10 µl Formamid aufgenommen und bis zur Sequenzierung bei 4°C gelagert.

2.8 ELISA

2.8.1 Gewinnung von Antigen

Die Gewinnung des Antigens erfolgte, sobald mikroskopisch ein deutlicher CPE erkennbar war. Die Zellen wurden im Medium mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 Minuten bei 2000U zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das *Pellet* mit 5ml PBS resuspendiert und in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000U, nach der der Überstand wiederum dekantiert wurde. Das entstandene *Pellet* wurde nun in 3ml PBS aufgenommen, bei -80°C gefroren und danach im Wasserbad die 37°C aufgetaut um die Zellen zu lysieren und so die enthaltenen Viruspartikel freizusetzen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Schließlich wurde erneut 10 Minuten bei 2000U zentrifugiert, der Überstand mit einer Pipette entnommen und bei -20°C gelagert. Dasselbe Protokoll wurde zur Gewinnung eines Kontrollantigens mit einer Zellkulturflasche mit nichtinfizierten Hep2-Zellen durchgeführt.

2.8.2 Materialien

2.8.2.1 Antikörper

Monoklonale Antikörper aus der Maus :

Anti-RSV-F Antikörper: 2F, 47F, 101F

Anti-RSV-G-Antikörper: 021/1G, 021/2G, 021/5G, 021/7G, 021/8G, 021/9G, 021/19G, 021/21G, 59G, 63G, 68G

Die monoklonalen Antikörper 2F, 47F, 59G, 63G und 68G wurden gegen den RSV Long strain vom Genotyp A1, welcher 1956 isoliert wurde, produziert (52), die Antikörper 021/1G, 021/2G, 021/5G, 021/7G, 021/8G, 021/9G, 021/19G sowie 021/21G gegen Mon/3/88, ein

RSV-Isolat des Genotyps A2, welches 1988 isoliert wurde (84). Die Anti-RSV-G-Antikörper lassen sich nach ihrer Reaktivität mit humanen RSV-Isolaten in drei Gruppen unterteilen: Die Antikörper 021/1G und 021/21G binden an konservierte Epitope beider RSV-Subgruppen. 021/2G und 021/19G reagierten nur mit Isolaten der Gruppe A, sie sind also gruppenspezifisch. Schließlich gibt es noch eine Gruppe von Antikörpern (021/5G, 021/7G, 021/8G und 021/9G), welche an variable bzw. Stamm-spezifische Epitope binden (84). Der Antikörper 2F bindet in der antigenetischen Region Ia, 47F in der Region II. Die Aminosäurereste 423-436 des RSV-F-Proteins bilden die Bindungsregion des chimären Antikörpers 101F (147). Die Epitope der Anti-RSV-G-Antikörper lassen sich der Abbildung 4 entnehmen.

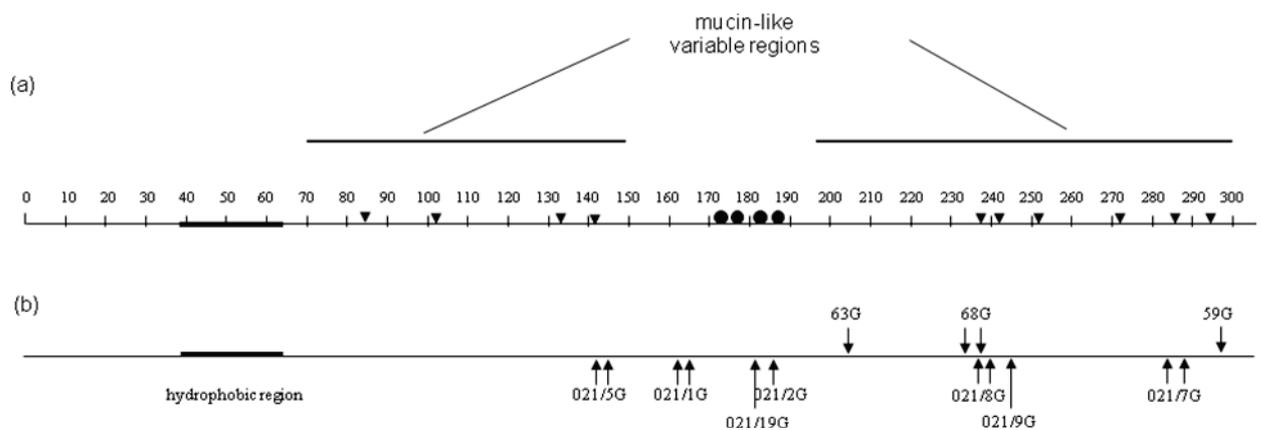


Abb. 4: **Struktur des HRSV G-Proteins und Epitope der Anti-RSV-G-Antikörper:** (a) Lineare Abbildung des G-Proteins; (▼) potentielle N-Glykosylierungsstelle; (•) Cystein-Rest; (b) Epitope der monoklonalen Antikörper; (↑) MAb gegen Mon/3/88; (↓) MAb gegen RSV-Long/1956; Das konservierte Epitop, an welches der Antikörper 021/21G bindet, ist noch nicht kartiert.

Kontrollantikörper:

Mouse Anti-RSV Fusion Protein (Serotec MCA 490, Batch No. 110106)

Konjugatantikörper:

ECLTM Anti-Mouse IgG HRPO linked Fab2 fragment (Amersham NA9310V)

Reagenzien:

DADE-Behring ELISA-Reagenzien (Supplementary Reagents for Enzygnost/TMB; LOT 37498):

Waschpuffer-POD (Konzentrat): Phosphate-buffered solution with Tween (90mmol/l), pH 6,5

Chromogen TMB: Tetramethylbenzidine dihydrochloride

Buffer/Substrate TMB: Hydrogen peroxide in Na-Acetattuffer, pH 4,1

Stopplösung POD: 0,5 M H₂SO₄

Coating Buffer: Na₂CO₃ (1,59g), NaHCO₃ (2,93g) ad 1l aqua dest.

Block- und Inkubationslösung: 10% FCS in PBS

2.8.3 Proteinbestimmung nach Bradford

2.8.3.1 *Materialien*

96 well Microtiterplatte

BSA-Standard: bovines Albumin (Albumin Fraktion V, Firma Roth, Art. 8076.3); Aliquots à 0, 20, 40, 60, 80 und 120 µg/ml Protein

Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay; Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad Laboratories GmbH; Cat. No. 500-0006)

Antigen und Kontrollantigen s.o.

2.8.3.2 *Durchführung*

Das Bradford-Reagenz wurde in aqua dest. 1:5 vorverdünnt. Von dieser Lösung wurden 200µl in jedes *well* der Microtiterplatte pipettiert. Das Antigen und das Kontrollantigen wurden jeweils 1:20 und 1:40 in aqua dest. verdünnt. Im Doppelansatz wurden 50µl Standard bzw. Probe zum Bradford-Reagenz gegeben. Die Auswertung der Farbreaktion erfolgte im SLT-Rainbow-Photometer mit Hilfe des Programms easy win fitting.

2.8.4 Durchführung des ELISAs

Antigen und Kontrollantigen wurden in *Coating Buffer* so vorverdünnt, dass die Proteinkonzentration 3µg/ml betrug. In jedes *cup* der Microtiterplatte wurden 100µl dieser Lösung pipettiert. Nach Lagerung bei 4°C für eine Nacht wurden die Platten ausgeschlagen und nach Zugabe von 200µl Blocklösung pro *well* 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen. Die Platten wurden nun entweder sofort ausgewertet, oder nach Trocknen bei 4°C gelagert.

Der Kontrollantikörper wurde in Inkubationslösung 1:10 vorverdünnt. In die Spalte A der Microtiterplatte wurden in jedes *cup* 90µl Inkubationslösung pipettiert, in die darauffolgenden Spalten 75µl. Nun wurden 10µl jeweils eines Antikörpers in die *wells* der Spalte A pipettiert, wobei jeder Antikörper mit jedem Antigen getestet wurde. Es erfolgte dann eine Ausverdünnung des Antikörpers, indem immer 25µl von Spalte zu Spalte bis H übertragen wurden. Aus Spalte H wurden 25µl verworfen. Es folgte eine 60 minütige Inkubationszeit in einer Feuchtkammer bei 37°C, nach deren Beendigung die Platten erneut dreimal gewaschen wurden.

Der Konjugatantikörper wurde 1:1000 in Inkubationslösung vorverdünnt. In jedes *cup* der Microtiterplatte wurden 75µl dieser Lösung pipettiert. Nach einer weiteren 60 minütigen Inkubationszeit bei 37°C und dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe von 50µl Substrat je

cup, das zuvor im Substrat Puffer 1:10 verdünnt wurde. Nach etwa 15 bis 20 Minuten wurden 75µl Stopplösung hinzugegeben.

Die Messung der Farbreaktion erfolgte bei 450nm im SLT Rainbow Photometer. Die Referenzwellenlänge wurde auf 620nm eingestellt. Zur Auswertung wurde das Programm Easy Win Screening verwendet. Eine Reaktivität von $OD_{450} < 0.2$ in der ersten Verdünnungsreihe wurde als negativ definiert. Eine positive Reaktion in zumindest zwei Verdünnungsstufen wurde als Reaktivität der Antikörper gegen die Wildisolate gewertet, eine positive Reaktion nur in der ersten Verdünnungsstufe als Partialreaktivität (s. Abb. 13). Ferner wurde ein Reaktivitätsscore der monoklonalen Antikörper erstellt (s. Abb. 12). Als Endpunkt wurde die höchste \log_2 Verdünnungsstufe, welche einen $OD_{450} > 0.2$ erreichte, definiert. Maximal konnten zehn Verdünnungsstufen erreicht werden. Die Summe der Endpunkte der 4 Anti-F-Antikörper bzw. der 11 Anti-G-Antikörper ergab den Reaktivitätsscore.

2.9 RSV-Antigennachweis in infizierten Zellen mittels ELISA

2.9.1 Materialien

Microtiterplatte

Waschpuffer 1: PBS

Waschpuffer 2: 0,5% Tween-20 in PBS

Fixierungslösung: Aceton:Methanol (1:1)

Blocklösung: 5% FCS, 2% BSA in PBS

Verdünnungspuffer: 5% FCS, 0,5% Tween-20 in PBS

1. Antikörper: Mouse Anti-RSV Fusion Protein (Serotec MCA 490, Batch No. 110106)

Konjugatantikörper: ECLTM Anti-Mouse IgG HRPO linked Fab2 fragment (Amersham NA9310V)

Substrat: Phosphate-Citrate-buffer with sodium perborate capsules (Sigma P-4922)

o-Phenylene dihydrochloride 30 mg/tab (Sigma P8412)

Stopplösung: 1 M H₂SO₄

2.9.2 Durchführung

Nach Ausschlagen der Platten zur Entfernung des Zellkulturüberstandes erfolgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer 1 mit 200µl je Cup. Zur Fixierung der Zellen und Viruspartikel wurden in jedes *cup* 200µl Fixierungslösung pipettiert und zehn Minuten bei -20°C inkubiert. Die Lösung wurde daraufhin dekantiert und die Platte einmal mit Waschpuffer 2 gewaschen. Nach Hinzugabe von 200µl Blocklösung in jedes *cup* folgte eine Inkubationszeit von 60 Minuten auf einem Kipp-Schüttler bei Raumtemperatur. Es wurde daraufhin erneut mit Waschpuffer 2 gewaschen. Der erste Antikörper wurde in Verdünnungspuffer 1:800 verdünnt. Von dieser Lösung wurden 100µl in jedes *cup* der Microtiterplatte pipettiert und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen, woraufhin 100µl des in Verdünnungspuffer 1:1000 verdünnten Konjugatantikörpers in jedes *cup* gegeben wurden. Nach weiteren 60 Minuten Inkubation wurde die Platte noch einmal gewaschen. Es wurden dann in jedes *cup* 100µl Substrat pipettiert. Die darauf folgende Inkubationszeit betrug fünf bis zehn Minuten. Nach Zugabe von 50µl Stopplösung in jedes *cup* erfolgte die Messung der Extinktion im Photometer (SLT Rainbow) bei 492nm. Zur Auswertung wurde das Programm easy win screening verwendet.

2.10 TCID50

2.10.1 Materialien

HEp2 Zellen

RSV-Patientenisolate (s. 2.1, außer 12076/2008 und 12653/2008)

Erhaltungsmedium: DMEM mit 1% Penicillin, Streptomycin und 2% FCS

Wachstumsmedium: DMEM mit 1% Penicillin, Streptomycin und 10% FCS

96 well Microtiterplatten

2.10.2 Durchführung

Am ersten Tag erfolgte die Vorbereitung der Zellkulturplatten. HEp2 Zellen wurden in DMEM aufgenommen, in der Zählkammer gezählt und mit einer Endkonzentration von etwa 5×10^4 Zellen/ml zum Wachstumsmedium gegeben. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl in jedes *cup* der ersten zehn Spalten der Microtiterplatte pipettiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Am folgenden Tag sollten die Zellen zu etwa 30% konfluent sein. In einer sterilen 96 well Zellkulturplatte wurde die Verdünnungsreihe des Inokulums im vierfach Ansatz hergestellt. Dazu wurden in die Spalten eins bis zehn der Microtiterplatte pro *cup* 180µl Erhaltungsmedium vorgelegt. In die erste Spalte wurden dann 20µl des jeweiligen Inokulums hinzugegeben, sodass dieses in einer Konzentration von 10^{-1} vorlag. Es erfolgte dann eine Übertragung von jeweils 20µl von links nach rechts bis zur neunten Spalte, aus der die überschüssigen 20µl verworfen wurden. Hierbei wurden für jeden Pipettierschritt neue Pipettenspitzen verwendet.

Für die Inokulierung der Zellen wurde zunächst das Medium aus der Zellkulturplatte abgesaugt und in jedes cup 100µl Erhaltungsmedium vorgelegt. Nun wurde das vorverdünnte Inokulum von der Mutterplatte auf die Zellkulturplatte übertragen, wobei von rechts nach links pipettiert wurde. Die zehnte Spalte diente als Negativkontrolle, hier wurde lediglich Medium übertragen. Die Zellkulturplatten wurden zwei bis drei Tage bei 34°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und mittels *ELISA* (s. 2.9) ausgewertet.

2.11 Neutralisationstest

2.11.1 Materialien

HEp2 Zellen

RSV-Patientenisolate (s. 2.1, außer 12076/2008 und 12653/2008)

Erhaltungsmedium: DMEM mit 1% Penicillin, Streptomycin und 2% FCS

Wachstumsmedium: DMEM mit 1% Penicillin, Streptomycin und 10% FCS

DPBS

96 well Microtiterplatten

Monoklonale Antikörper aus der Maus:

Anti-RSV-F Antikörper: 2F, 47F, 101F

Anti-RSV-G-Antikörper: 021/1G, 021/2G, 021/5G, 021/7G, 021/8G, 021/9G, 021/19G, 021/21G, 59G, 63G, 68G

Kontrollantikörper:

Mouse Anti RSV Fusion Protein (Serotec MCA 490, Batch No. 110106)

Synagis[®] (lot: 03N603F2), 1:100 vorverdünnt in PBS

Negativkontrolle:

DPBS

2.11.2 Durchführung

Die Vorbereitung der Zellkulturplatten erfolgte wie in 2.10.2 beschrieben, wobei nun in jedes *cup* der Microtiterplatte Zellen eingesät wurden. Am zweiten Tag wurde das Inokulum hinzugegeben. Die erforderliche Verdünnung des Virus sollte zunächst anhand des zuvor bestimmten TCID50-Wertes hergestellt werden. Das Ziel war eine Verdünnung von 100 TCID50 pro 100µl. Nach einigen derartigen Versuchen zeigte sich allerdings, dass sich die Infektiosität der Virusisolate anscheinend verändert hatte, denn der erwartete CPE blieb auch nach einigen Tagen Inkubationszeit nur schwach ausgeprägt. Daher wurde als Inokulum im Folgenden frischer Zellkulturüberstand verwendet. Die für den Neutralisationstest erforderliche Verdünnung wurde nun mit Hilfe der real-time PCR (s. 2.4.3) oder anhand des mikroskopisch erkennbaren CPEs bestimmt. Um in diesem Ansatz Rückschlüsse auf den TCID50-Wert ziehen zu können, erfolgte eine Rücktitration in den Spalten 11 und 12 der Microtiterplatte.

Die Virusisolate 5138/1996, 3027/1999, 4615/2000, 4803/2001, 4849/2001, 7497/2001, 2111/2002, 2363/2003, 3287/2003, 3318/2004, 3368/2004, 2589/2005, 6122/2005, 33406/2006, 40911/2006 und 1365/2007 wurden mit jedem einzelnen Antikörper im Doppeltansatz im Neutralisationstest geprüft. Dafür wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Medium	240	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	180	180	
Serum	60											20	20	Virus 10 ⁻¹		
Übertrag	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	20	20	Virus 10 ⁻²
														20	20	Virus 10 ⁻³
														20	20	Virus 10 ⁻⁴
														20	20	Virus 10 ⁻⁵

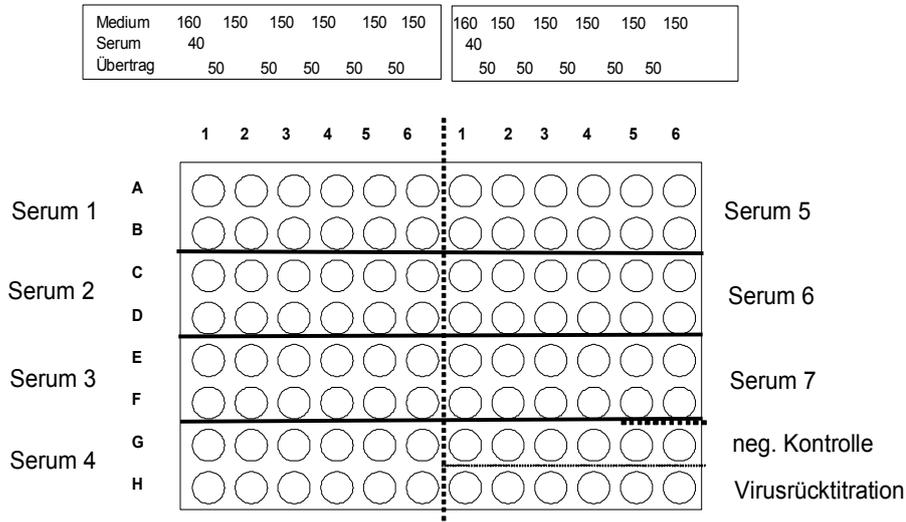
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

In die erste Spalte der Microtiterplatte wurden zu 240µl Erhaltungsmedium 60µl des Antikörpers pipettiert. In die Spalten zwei bis zehn wurden 150µl Erhaltungsmedium vorgelegt. Nun wurden jeweils 150µl von der Spalte eins bis zur Spalte zehn übertragen, wobei die überschüssigen 150µl aus dem letzten *cup* verworfen wurden. Nach jedem Pipettierschritt wurden die Pipettenspitzen gewechselt. In jedes *cup* der Spalten eins bis zehn wurden 100µl des vorverdünnten Virusinokulums gegeben. Die Microtiterplatte wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium aus der am vorangegangenen Tag vorbereiteten Zellkulturplatte geschlagen. Es folgte die Übertragung von 200µl Inokulum mit Antikörper aus der Mutterplatte in die Zellkulturplatte, wobei von rechts nach links pipettiert wurde. Die Platte wurde für etwa drei bis sechs Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert, bis mikroskopisch ein deutlicher CPE bei der Negativkontrolle und in den ersten *cups* der Rücktitration zu erkennen war. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des *ELISAs* (s. 2.9).

Da bei der Durchführung des Neutralisationstests nach o.g. Protokoll mit 16 RSV-Isolaten kaum ein neutralisierender Effekt der einzelnen Antikörper erkennbar war, wurde im Folgenden sowohl mit einzelnen Antikörpern, als auch mit Antikörper-Cocktails gearbeitet.

Antikörper:

	Mab	Mab	Mab	Mab	Mab	Mab	Mab
Serum 1	2F						
Serum 2	47F						
Serum 3	021/1G						
Serum 4	021/21G						
Serum 5	021/2G	68G					
Serum 6	021/1G	021/2G	021/19G	021/21G	59G	63G	68G
Serum 7	021/5G	021/7G	021/8G	021/9G			



Das weitere Vorgehen entsprach dem oben genannten.

2.12 Testung zum Vorliegen eines Antikörper Enhancements

Bei der Auswertung der Neutralisationstests im *ELISA* fiel auf, dass die Kombination der Antikörper 021/1G bzw. 021/21G mit den RSV-Isolaten ein stärkeres Signal hervorrief als die antikörperfreie Kontrolle mit DPBS. Außerdem ließ die Intensität des Signals mit abnehmender Antikörperkonzentration nach, wohingegen sie in der Kontrollreihe weitgehend konstant blieb. Um zu überprüfen, ob diesem Effekt das Prinzip des Antikörper-Enhancement zu Grunde liegt, wurde ein weiterer Test durchgeführt.

Materialien und Durchführung

HEp2 Zellen

RSV Long Strain

Erhaltungsmedium: DMEM mit 1% Penicillin, Streptomycin und 2% FCS

Wachstumsmedium: DMEM mit 1% Penicillin, Streptomycin und 10% FCS

Monoklonale Antikörper 021/1G, 021/21G

DPBS

24 well Platte

Am ersten Tag wurden zwei 24 well Platten durch Einsaat der HEp2 Zellen vorbereitet und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Zellen sollten am Folgetag eine Konfluenz von etwa 30% haben. Das Wachstumsmedium wurde am zweiten Tag abgesaugt und zunächst durch 1ml Erhaltungsmedium ersetzt. RSV Long Strain wurde in den Verdünnungsstufen 10⁻¹ für die erste Spalte der Mutterplatten, 10⁻² für die zweite und 10⁻³ für die dritte Spalte durch Verdünnung in DMEM vorbereitet (s. Abbildung). Je *cup* wurde 1ml des entsprechenden Gemischs pipettiert. Die vierte Spalte der Platten wurde ausschließlich mit 1ml Erhaltungsmedium als Kontrolle gefüllt. Es folgte die Zugabe der Antikörper: In die *cups* eins bis vier der Reihen A und B wurden 100µl des Antikörpers gegeben. Als Negativkontrolle wurden in die *cups* C1 bis C4 sowie D1 bis D4 jeweils 100µl DMEM pipettiert. Es schloss sich eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur an. Anschließend wurden 1,1ml pro *cup* von der Mutter- auf die Zellkulturplatten übertragen. Die Platten wurden für drei Tage bei 34°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Entwicklung des CPEs wurde täglich mit dem Mikroskop beurteilt. Zur Objektivierung des Ergebnisses wurden von Beginn an jeden Tag 50µl Überstand aus jedem *cup* als Probe entnommen, zu je 150µl PBS gegeben und bei -20°C gelagert, bis alle Proben gesammelt waren. Es folgte die Extraktion der RNA wie in 2.2 beschrieben. Der Versuch wurde mit Hilfe der *Real-time PCR* (s. 2.4.3) ausgewertet.

3 Resultate

3.1 Genetische Analyse

Durch die Sequenzierung der RSV-Wildisolate ließen sich 18 Isolate der Subgruppe A zuordnen, 6 Virusisolate (3027/1999, 211/2002, 3368/2004, 1365/2007, 4617/2007) gehörten der Subgruppe B an.

3.1.1 RSV-A F-Protein

Bei der Analyse der Nukleotid-Sequenzen der RSV-Wildisolate zeigte sich, dass das F-Gen im Gegensatz zum G-Gen gut konserviert ist. Der Stammbaum des F-Gens der RSV-A-Isolate ist der Abbildung 5 zu entnehmen.

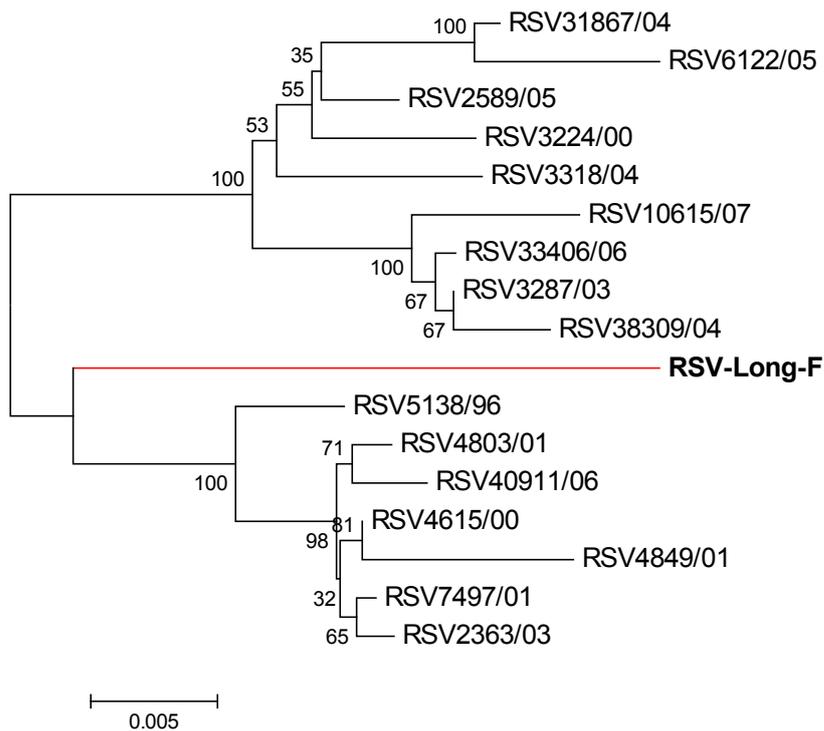


Abb. 5: **Stammbaum des F-Gens der RSV-Subtyp-A-Isolate**: fettgedruckt: Referenzstamm USA/Long/56. Der Stammbaum wurde mit Hilfe der „neighbor-joining“ Methode mit MEGA 4 erstellt. Die Bootstrap-Werte sind an den Verzweigungen angegeben.

3.1.2 RSV-A G-Protein

Durch die Analyse der RSV-G-Sequenzen konnten die in der Studie verwendeten Wildisolate den Genotypen GA5 und GA2 zugeordnet werden. Mit Ausnahme des Isolats 3224/2000 gehörten die in den Jahren 1996 bis 2003 in Düsseldorf isolierten Respiratorischen Synzytial Viren sowie das Isolat 40911/2006 dem Genotyp GA5 an (7 Isolate). Im Jahr 2003 erfolgte ein Wechsel zum Genotyp GA2 (11 Isolate), dem auch das Isolat 3224/2000 zugeordnet werden konnte (s. Abb. 6). Der Stammbaum des RSV-G-Proteins zeigt, dass die GA2 Isolate auf zwei Äste verteilt sind, der *Bootstrap*-Wert beträgt 79%. Die GA5 Isolate zeigen eine geringere Variabilität in der Sequenz, sie sind auf einem Ast zu finden. Die p-Abstände gingen bei beiden Genotypen nicht über 0.04 hinaus.

Für das RSV-A-G-Protein wurde außerdem ein Stammbaum auf Proteinebene erstellt. Es ergaben sich dieselben Cluster wie bei den Nukleotidsequenzen (s. Abb.7).

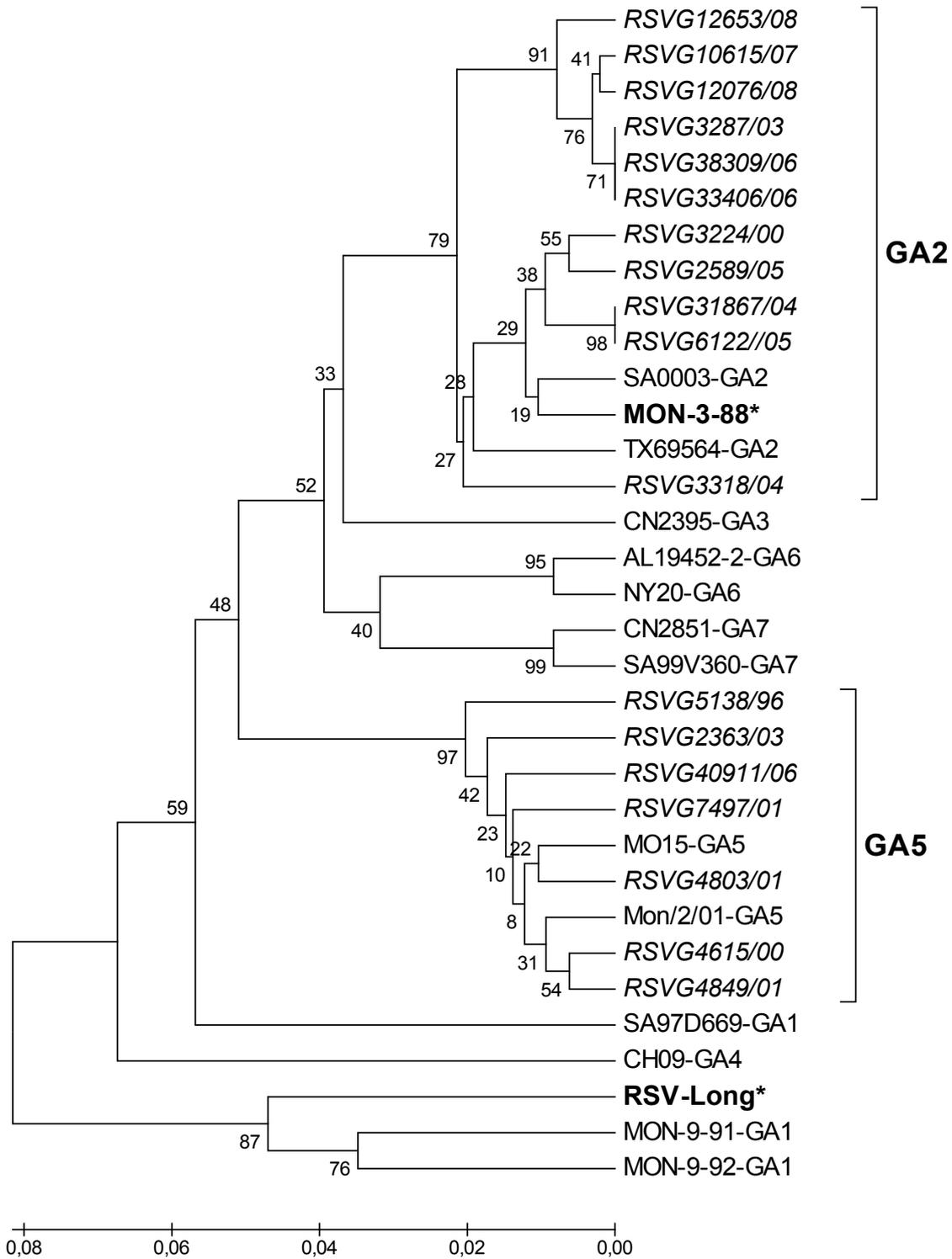


Abb. 6: **Stammbaum des G-Gens der RSV-Subtyp-A-Isolate**: Kursiv: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Virusisolate; Fettgedruckt: Referenzstämme USA/Long/56 und MON-3-88, gegen die die MAbs generiert wurden; Sequenzen, die die verschiedenen Genotypen repräsentieren, wurden aus der GenBank ausgewählt. Der Stammbaum wurde mit Hilfe der „neighbor-joining“ Methode mit 1,000 Replikationen mit MEGA 4 erstellt. Die Klammern auf der rechten Seite kennzeichnen die Genotypen. Die Bootstrap-Werte sind an den Verzweigungen angegeben. Die Skala kennzeichnet die Nummer der Nukleotidsubstitutionen.

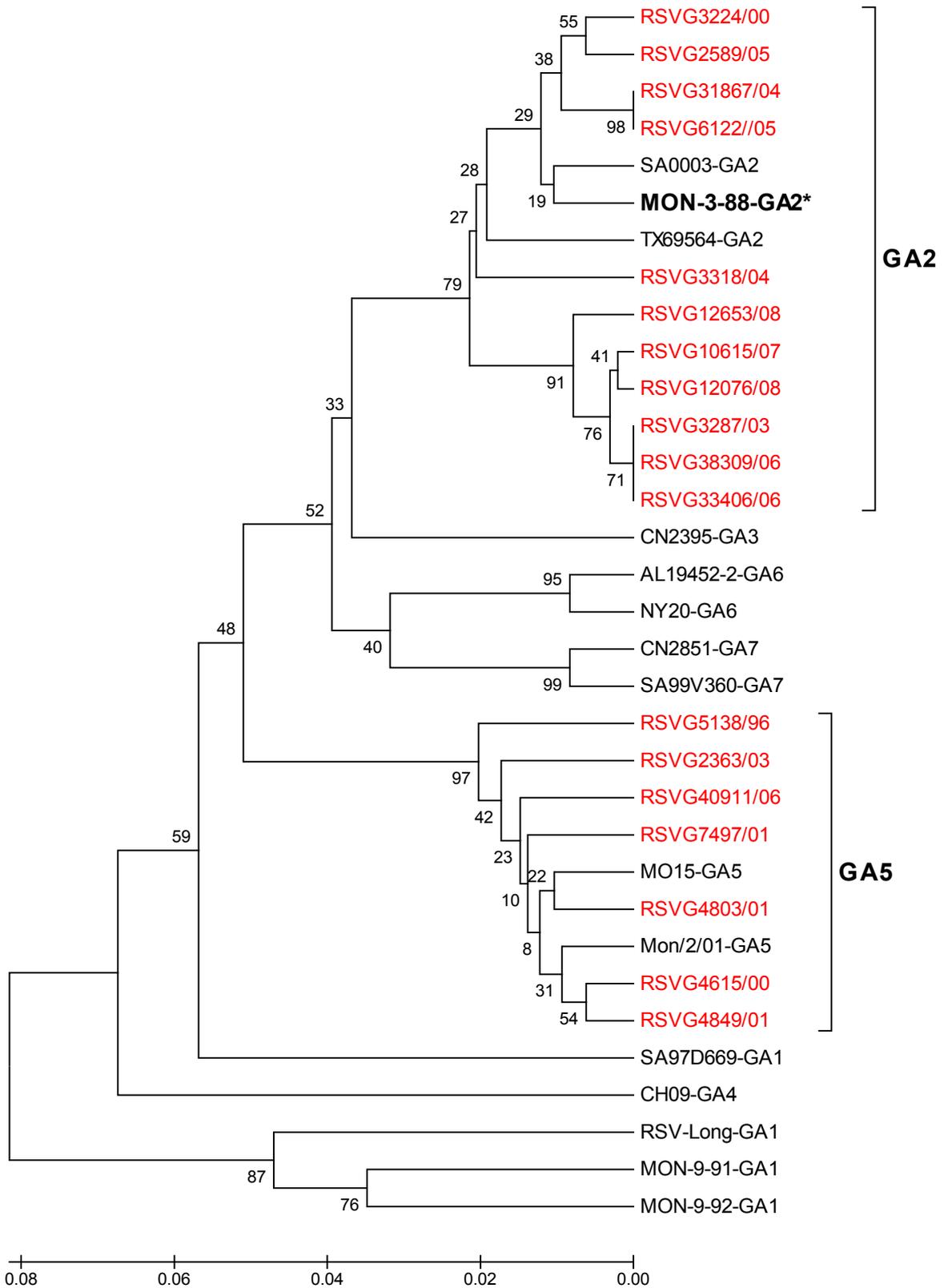


Abb. 7: **Stammbaum der RSV-Subtyp-A-Isolate auf Proteinebene**: rot: in der Arbeit verwendete RSV-Wildisolate, schwarz: Referenzisolate der Genotypen, fett gedruckt: Referenzstamm, gegen den die monoklonalen Antikörper generiert wurden.

3.1.3 RSV-B

Die RSV-B-Isolate *clustern* mit Ausnahme des Isolates 3368/2004 eng beieinander (s. Abb. 8). Bei der Sequenzierung des Genoms der G-Proteine der Virusisolate 4617/2007 und 1365/2007 zeigte sich eine aus 60 Basenpaaren bestehende Nukleotid-Duplikation im Bereich der Basenpaare 751 bis 810 (s. Abb. 9). Die RSV-B-Isolate scheinen mit den RSV-A-Isolaten zu kozyklulieren, es ließ sich keine Häufung von Infektionen mit RSV-B in einer Saison erkennen.

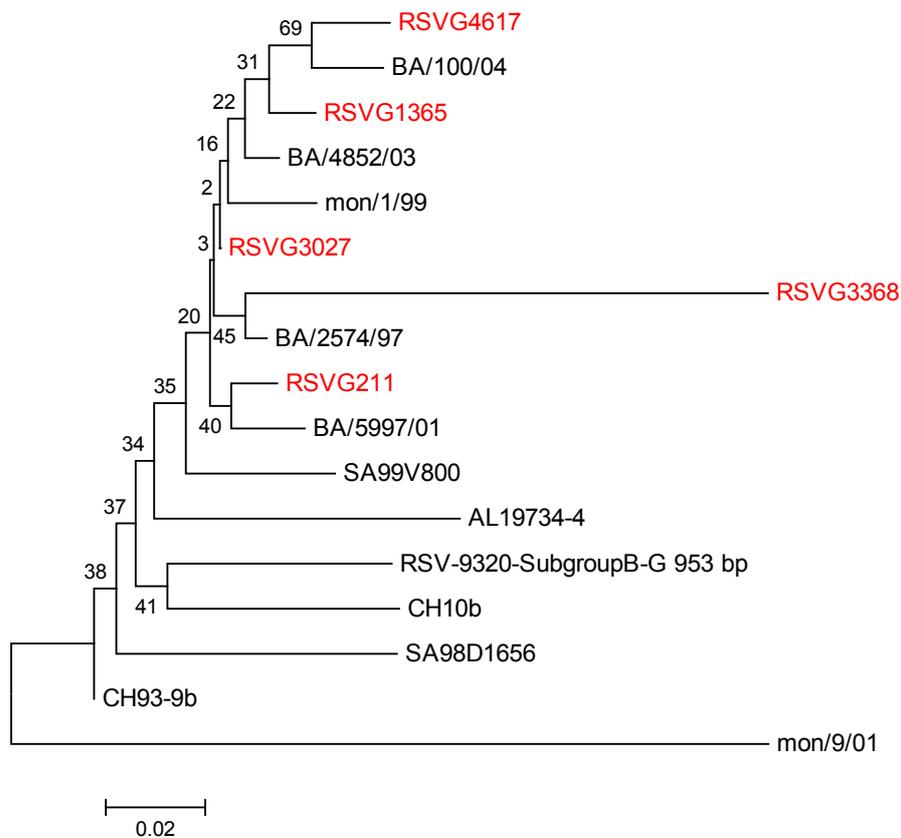


Abb. 8: **Stammbaum der RSV-Subtyp-B-Isolate auf Nukleotidebene:** rot: in der Arbeit verwendete RSV-Wildisolate, schwarz: Referenzisolate der Genotypen. Der Stammbaum wurde mit Hilfe der „neighbor-joining“ Methode mit MEGA 4 erstellt. Die Bootstrap-Werte sind an den Verzweigungen angegeben.

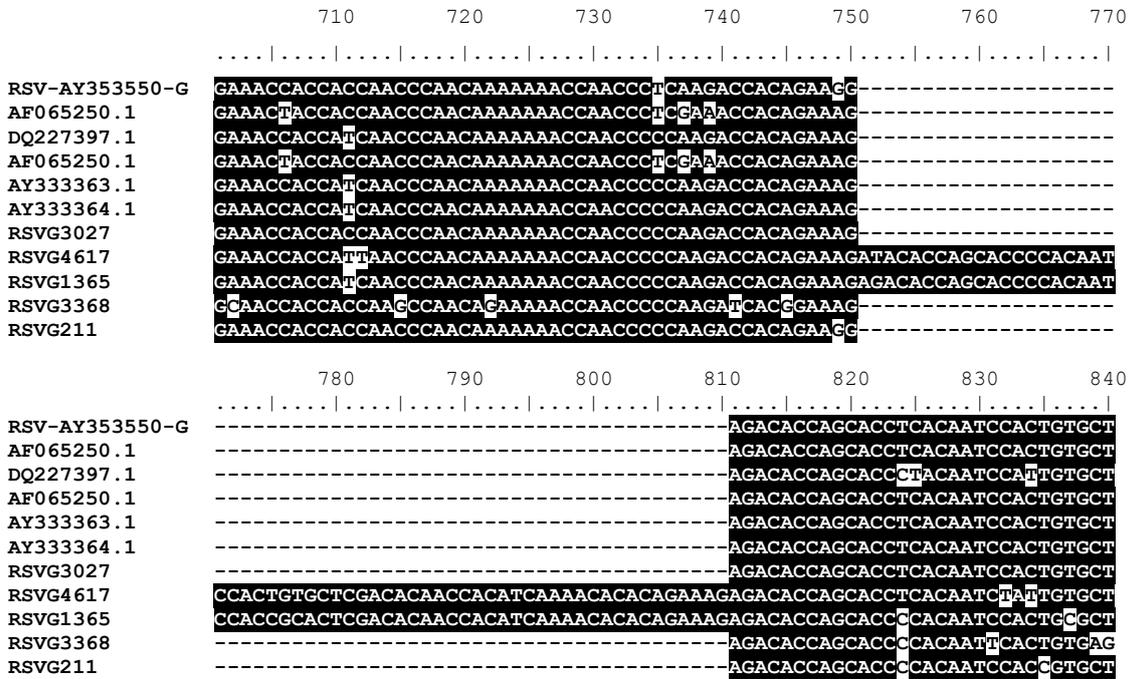


Abb. 9: RSV-B-Gen-Duplikation der RSV-Isolate 4617/2007 und 1365/2007

3.2 Nukleotid- und Aminosäuredivergenz

Mit Hilfe des „SNAP“ (Synonymous Non-synonymous Analysis Program; (76); (3)) erfolgte eine statistische Auswertung der Nukleotid- und Aminosäuredivergenz des G-Proteins und des F-Proteins der RSV-A-Isolate einerseits auf das gesamte Protein bezogen, andererseits getrennt für die beiden variablen, muzinähnlichen Regionen des G-Proteins (s. Tab. 2). Insgesamt überwogen im RSV-G-Protein die Transitionen, wobei die Sequenzen des Genotyps GA5 (Transition/Transversion bias $R=1.62$) im Vergleich zu denen des Genotyps GA2 (Transition/Transversion bias $R=1.86$) relativ mehr Transversionen aufwiesen. Die Nukleotid- und Aminosäuredivergenz des G-Proteins waren bei den RSV-Isolaten des Genotyps GA5 ebenfalls geringfügig stärker ausgeprägt als bei den Isolaten des Genotyps GA2. Ferner wiesen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten RSV-Wildisolate des Genotyps GA5 relativ gesehen mehr nichtsynonyme Mutationen auf als diejenigen des Genotyps GA2.

Die Anzahl der synonymen und nichtsynonymen Mutationen nahmen im Bereich der Ektodomäne des G-Proteins deutlich zu. Im Bereich der ersten muzinähnlichen Region betrug der Transition/Transversion bias R 1,66, es lag ein im Vergleich zum Gesamtprotein erhöhter Anteil nichtsynonymer Mutationen vor. Im Gegensatz dazu fanden sich in der zweiten muzinähnlichen Region relativ gesehen weniger nichtsynonyme Mutationen, der Transition/Transversion bias R betrug hier 3,26. Die muzinähnliche Region I der RSV-GA5 Isolate wies den höchsten Wert für die *synonymous-/non-synonymous-ratio* auf.

Es fanden sich einige genotypspezifische Mutationen im G-Protein der analysierten RSV-Wildisolate: Durch eine Mutation im Bereich des ersten Stoppkodons wiesen die GA5 Isolate ein G-Protein aus 298 Aminosäuren auf, während dem G-Protein der GA2 Isolate eine Aminosäure fehlte. Die GA5 Isolate waren durch die Aminosäure Serin an Position 251 und Threonin an Position 274 gekennzeichnet. Außerdem fanden sich bei den GA5 Isolaten die genotypspezifischen Mutationen N191S, T241P sowie P247T. Eine Ausnahme bildete das RSV-Isolat 4615/2000, welches anstelle der T241P Mutation an Position 241 Serin statt Threonin aufwies. Bei zwei der GA2 Isolate (31867/2004 und 6122/2005) fand sich eine R244N Substitution. Die GA2 Isolate zeichneten sich durch die Aminosäure Threonin an Position 241 aus.

Im Vergleich zum RSV-G-Protein zeigte das RSV-F-Protein eine deutlich geringere Variabilität in der Aminosäureabfolge. Die Nukleotiddivergenz war bei beiden Genotypen im Bereich des F-Proteins stärker ausgeprägt als die Aminosäurendivergenz (1,7% bzw. 1,5% für GA2; 1,0% bzw. 0,9% für GA5). Dies zeigte sich auch in der Berechnung der ds/dn-ratios mit Werten von 9,56 für GA2 Isolate und 6,565 für GA5 Isolate.

			Nukleotid- und Aminosäuredivergenzen					Syn/Non-synonymous Analyse			transition/transversion bias
			Nukleotid-Divergenz	SEM	Aminosäure divergenz	SEM	ND/AAD	ds	dn	ds/dn	
RSV-A-G-Gen	RSV-A-G (gesamt)	Alle (n=18)	6,36%	0,059	10,39%	0,0117	0,61	0,106	0,053	2,183	2,35
		GA2 (n=11)	3,48%	0,049	5,55%	0,009	0,63	0,065	0,029	2,510	1,86
		GA5 (n=7)	3,54%	0,0039	5,65%	0,083	0,63	0,057	0,029	2,089	1,62
	Mucin-like VR I	Alle (n=18)	7,70%	0,012	14,30%	0,025	0,54	0,106	0,063	1,680	1,66
		GA2 (n=11)	4,70%	0,012	8,60%	0,021	0,55	0,065	0,040	1,620	nd
		GA5 (n=7)	2,90%	0,009	6,40%	0,02	0,45	0,038	0,037	1,020	nd
	Mucin-like VR II	Alle (n=18)	4,10%	0,018	11,30%	0,021	0,36	0,123	0,052	2,300	3,26
		GA2 (n=11)	2,10%	0,005	5,00%	0,013	0,42	0,027	0,030	1,107	nd
		GA5 (n=7)	3,70%	0,007	7,00%	0,016	0,53	0,040	0,033	1,210	nd
RSV-A-F-Gen		Alle (n=16)	2,70%	0,002	1,70%	0,002	1,59	0,101	0,008	13,710	2,15
		GA2 (n=9)	1,70%	0,002	1,50%	0,003	1,13	0,053	0,007	9,560	1,61
		GA5 (n=7)	1,00%	0,001	0,90%	0,002	1,11	0,029	0,005	6,565	2,40

Tabelle 2: Nukleotid- und Aminosäuredivergenzen sowie Synonyme-/Nicht-synonyme Mutationen (ds/dn) des G- und F-Proteins der RSV-A-Viren. Mucin-like VR I/II: Mucinähnliche variable Region I/II; SEM: Standardfehler, ND/AAD: Nukleotiddivergenz/Aminosäuredivergenz

3.3 Glykosylierung des G-Proteins

Das RSV-G-Protein ist in hohem Ausmaße glykosyliert. Die O-glykosidischen Bindungen erfolgen an den Aminosäuren Serin und Threonin. Die Aminosäuresequenz, die eine extensive O-glykosidische Bindung ermöglicht, lautet Lysin-Prolin- X_n -Threonin-Threonin-Lysin- X_n (113,116). Diese O-Glykosylierungssequenz war bei allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten RSV-Isolaten im Bereich der Aminosäurereste 201-212 sowie 216-221 konserviert. Dem Virusisolat 2363/2003 fehlten im Vergleich zu den anderen RSV-Wildisolaten zwei O-Glykosylierungsstellen in den Aminosäuresequenzabschnitten 221-229 sowie 233-240. Letztere ließ sich auch bei den anderen Wildisolaten des Genotyps GA5, mit Ausnahme von 40911/2006, nicht nachweisen.

Die Analyse des gesamten G-Proteins durch das Programm NetOglyc zeigte 30-55 potentielle O-Glykosylierungssequenzen auf, welche allesamt in der Ektodomäne lokalisiert waren. Der Vorhersagewert des Programmalgorithmus (*G-scores*) betrug 0.5 bis 0.8. Die RSV-Isolate vom Genotyp GA2 wiesen mit 50.81 (Standardabweichung 2.85, $p < 0.001$) potentiellen O-Glykosylierungsstellen ein höheres Maß an Glykosylierung auf als die RSV GA5 Isolate (36.2 potentielle Glykosylierungsstellen, Standardabweichung 6.47). Die O-Glykosylierungssequenzen sind in Abbildung 10 dargestellt.

Für eine N-glykosidische Bindung ist die Aminosäurefolge Asparagin-X-Threonin/Serin erforderlich, wobei X nicht Prolin sein darf (113). Eine konservierte N-Glykosylierungsstelle fand sich an Position 85 bis 87. Ein möglicher N-Glykosylierungsort im Bereich der Aminosäuren 103 bis 105 fehlte lediglich den Virusisolaten 10615/2007, 12076/2008 und 12653/2008. Das erstgenannte RSV-Isolat zeigte auch eine Mutation in der Glykosylierungssequenz der Aminosäuren 135 bis 137. Durch eine Mutation der Aminosäureposition 237 (N/D) fehlte den ab dem Jahr 2006 isolierten RSV Genotyp GA2 Isolaten, sowie dem im Jahr 2003 isolierten RSV-Isolat 3287, eine N-Glykosylierungsstelle im Bereich der zweiten variablen Region des G-Proteins. Ebenso ließ sich diese Glykosylierungssequenz bei dem GA5 Isolat 2363/2003 (N/I) nicht nachweisen. Die beiden RSV-Wildisolate 31867/2004 und 6122/2005 zeichneten sich durch eine zusätzliche N-Glykosylierungssequenz an Position 244 bis 246 aus. Schließlich zeigten sich zwei weitere konservierte Glykosylierungssequenzen im Bereich der Aminosäurereste 250/251 bis 252/253 und 294 bis 296. Die potentiellen Glykosylierungsstellen zeigt die Abbildung 11.

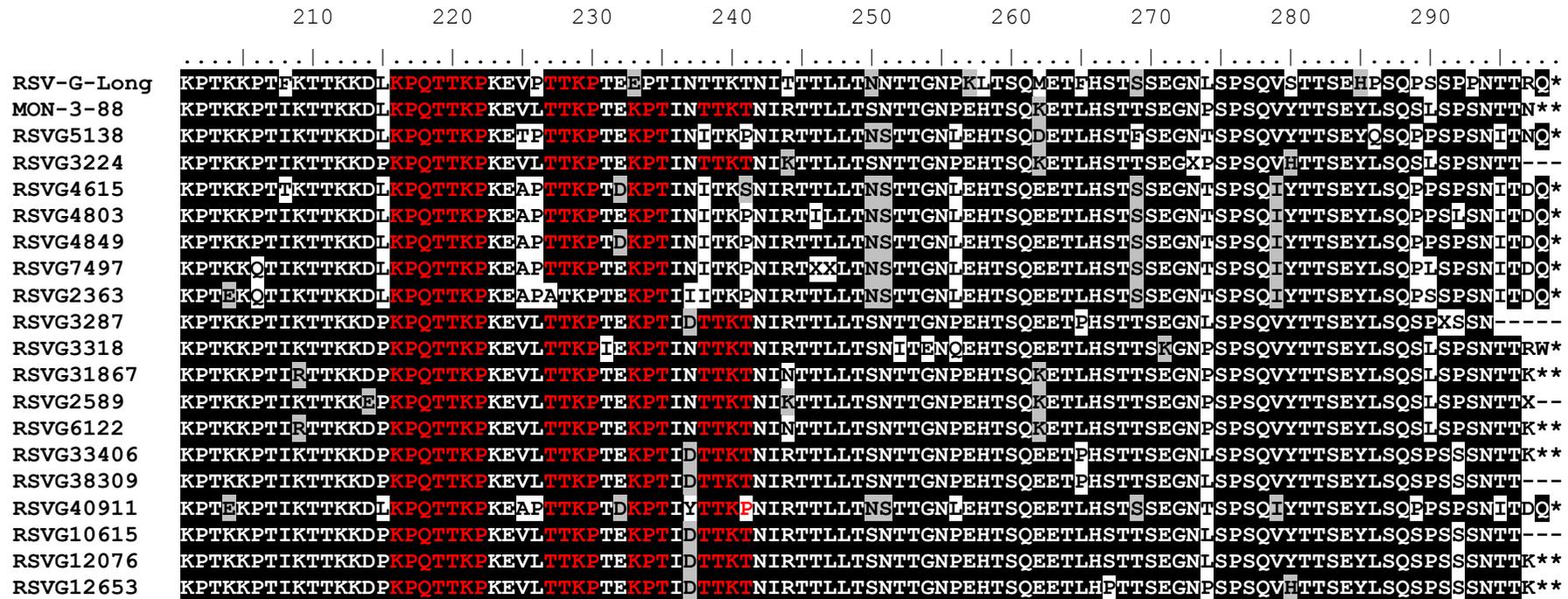


Abb. 10: **O-Glykosylierungssequenzen:** Aminosäuresequenzen der RSV-Subtyp A-G-Proteine im C-terminalen Bereich von Position 204-300. Die O-Glykosylierungssequenzen des RSV-G-Proteins sind rot markiert.

	70	80	90	100	110	120
RSV-G-Long-Ref	FIASANHKVTLTTAI IQDATS	QIKNTT	PTYLTQD	PQLGISFSNLS	ETTSQ	TTILASTTP
MON-3-88	FIASANHKVTLTTAI IQDATN	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFSNLS	ETTSQ	PTTILASTTP
RSVG5138	FIASANNKVTLLTTAI IQDATS	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFFNLS	GTTTSQ	TAILASTTP
RSVG3224	FIASANHKVTLTTAI IQDATN	LKNTT	PTYLTQNP	QLGISFSNLS	ETTSQ	PITILASTTP
RSVG4615	FIASANNKVTLLTTAI IQDATS	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFFNLS	GTTTSQ	TAILASTTP
RSVG4803	FIASANNKVTLLTTAI IQDATS	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFFNLS	GTTTSQ	TAILASTTP
RSVG4849	FIASANNKVTLLTTAI IQDATS	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFFNLS	GTTTSQ	TAILASTTP
RSVG7497	FIASANNKVTLLTTAI IQDATS	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFFNLS	GTTTSQ	TAILASTTP
RSVG2363	FIASANNKVTLLTTAI IQDATS	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFFNLS	GTTTSQ	TAILASTTP
RSVG3287	FIASANHKVTLTTAI IQDATN	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFSNLS	GTTTSQ	STTILASTTP
RSVG3318	FIASANHKVTLTTAI IQDATN	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFSNLS	ETTSQ	PKPTTILASTTP
RSVG31867	FIASANHKVTLTTAI IQDATN	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFSNLS	ETTSQ	PITILASTTP
RSVG2589	FIASANHKVTLTTAI IQDATN	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFSNLS	ETTSQ	PITILASTTP
RSVG6122	FIASANHKVTLTTAI IQDATN	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFSNLS	ETTSQ	PITILASTTP
RSVG33406	FIASANHKVTLTTAI IQDATN	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFSNLS	GTTTSQ	STTILASTTP
RSVG38309	FIASANHKVTLTTAI IQDATN	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFSNLS	GTTTSQ	STTILASTTP
RSVG40911	FIASANNKVTLLTTAI IQDATG	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFFNLS	GTTTSQ	TAILASTTP
RSVG10615	FIASANHKVTLTTAI IQDATN	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFSNLS	PGTTTSQ	STTILASTTP
RSVG12076	FIASANHKVTLTTAI IQDATN	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFSNLS	PGTTTSQ	STTILASTTP
RSVG12653	FIASANHKVTLTTAI IQDATN	QIKNTT	PTYLTQNP	QLGISFSNLS	PGTTTSQ	PTTILASTTP
	130	140	150	160	170	180
RSV-G-Long-Ref	GVKSNLQPTTVKTKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
MON-3-88	SAESTPQSTTVKTKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG5138	SVESILQSTTVKTKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG3224	SAESTPQSTTVKIKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG4615	SVESTPQSTTAKTKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG4803	SVESILQSTTVKTKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG4849	SVESILQSTTAKTKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG7497	SVESILQSTTVKTKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG2363	SVESILQSTTVKTKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG3287	SAESTPQSTTVKIKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG3318	SAESTPQSTTVKTKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG31867	SAESTPQSTTVKIKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG2589	SAESTPQSTTVKIKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG6122	SAESTPQSTTVKIKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG33406	SAESTPQSTTVKIKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG38309	SAESTPQSTTVKIKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG40911	SVESILQSTTAKTKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG10615	SGESTXQSTTVKIKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG12076	SGESTXQSTTVKIKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP
RSVG12653	SAESTPQSTTVKIKNTT	TTQIQPSKPTTKQ	RQNKPPNKP	NNDFHFEV	NEFVPC	SICSNNP

3.4 ELISA

Im *ELISA* zeigten die Anti-RSV-F-Antikörper eine konstante Reaktivität mit den Virusisolaten. Neben dem als Kontrolle verwendeten Antikörper Serotec reagierten 47F und 101F sowohl mit den RSV-Isolaten der Subgruppe A, als auch mit denen der Subgruppe B. Die Testung des Antikörpers 2F zeigte positive Signale mit allen RSV-A-Isolaten, jedoch keine Reaktivität mit den RSV-B-Isolaten 211/02 sowie 3368/04.

Die Subgruppen-übergreifenden Antikörper 021/1G und 021/21G reagierten mit einer Ausnahme (021/21G mit dem Isolat 6122/05) mit allen RSV-Wildisolaten. Bei den als Gruppen-spezifisch klassifizierten Antikörpern 021/2G sowie 021/19G ließ sich ein zunehmender Verlust der Spezifität erkennen. Während 021/2G nicht mit allen RSV-A-Isolaten reagierte, zeigte 021/19G zwar eine Reaktivität mit diesen, jedoch auch mit den RSV-B-Isolaten aus dem Jahr 2007. Es ließ sich aber keine Korrelation zwischen dem Reaktivitätsverlust und einer Aminosäuresubstitution finden.

Der als stammspezifisch klassifizierte Antikörper 021/8G wies einen deutlichen Zusammenhang zwischen seiner Reaktivität mit den RSV-Wildisolaten und einer Mutation im Bereich seiner Bindungsstelle (Aminosäuren 237-239) (49,85) auf: Er reagierte nicht mit den GA2 Isolaten 3287/03, 33406/06, 38309/06, 10615/07, 12076/08 sowie 12653/08, welche allesamt durch die Substitution N237D gekennzeichnet waren. Des Weiteren zeigte er nur eine Partialreaktivität mit dem GA5 Isolat 2363/03, welches an derselben Position die Aminosäure Isoleucin statt Asparagin aufwies. Die genannten Mutationen führten bei den betroffenen RSV-Isolaten zu einem Verlust einer potentiellen N-Glykosylierungssequenz im Bereich der Bindungsstelle des monoklonalen Antikörpers. Der in der Nähe bindende Antikörper 021/9G zeigte ebenfalls einen Reaktivitätsverlust mit den in den Jahren 2006-2008 isolierten RSV-Isolaten, die die oben genannte Mutation aufwiesen.

Cane und Pringle beschrieben 1995 zwei Mutationen des RSV-G-Proteins, welche *in vitro* durch immunologische Selektion durch den monoklonalen Antikörper 63G entstanden (22). Die Mutation P206Q fand sich bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten RSV-Isolaten 7497/01 und 2363/03, die Substitution K209R bei 31867/04 und 6122/05. Beide Substitutionen führten zu einem Reaktivitätsverlust mit dem oben genannten Antikörper.

Auffallend war ein zunehmender Verlust an Reaktivität mit den neueren Virusisolaten (s. Abb. 12 und 13). Während Isolate aus den Jahren 1996 bis 2003 von durchschnittlich ein bis drei Antikörpern nicht detektiert wurden, so waren es bei jüngeren Isolaten bis zu sieben

Antikörper, die nicht mit den Viren reagierten. Zur genaueren Beurteilung des Reaktivitätsverlustes wurde die kumulative Reaktivität der Antikörper mit den RSV-A-Isolaten bestimmt (Abb. 12). Dazu wurden für jedes Isolat die Anzahl der Verdünnungsstufen, bis zu denen im *ELISA* eine Reaktivität mit den einzelnen Antikörpern erkennbar war, addiert und auf der Ordinate aufgetragen. Betrachtet man nun F- und G-Antikörper getrennt voneinander, dann wird deutlich, dass der Reaktivitätsverlust fast ausschließlich bei den RSV-G-Antikörpern zu beobachten ist. So zeigt die für die Anti-RSV-F-Antikörper berechnete Regressionsgerade keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Jahr der Virusisolierung und der Reaktivität mit Antikörpern ($r^2=0,11$). Im Gegensatz dazu fällt die Regressionsgerade in der Abbildung der Reaktivität der Anti-RSV-G-Protein-Antikörper signifikant ab ($r^2=0,431$).

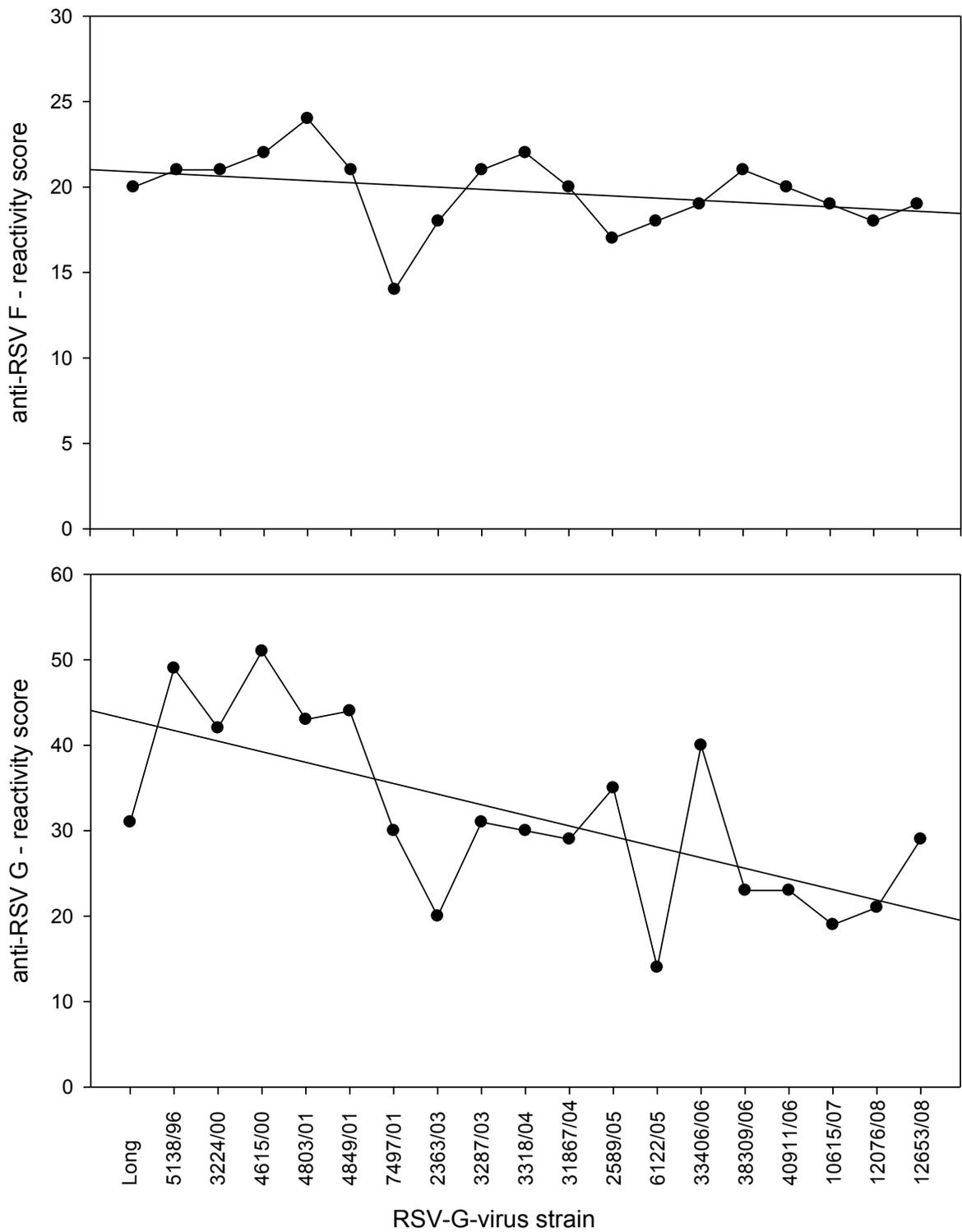


Abb. 12: Kumulative Reaktivität der RSV-A-Isolate mit monoklonalen Antikörpern: F-Antikörper (oben) und G-Antikörper (unten). Erläuterungen s. Text

3.5 TCID50

Um die Infektiosität der RSV-Zellkulturüberstände beurteilen zu können, wurde die *Tissue Culture Infectious Dosis 50* der Wildisolate bestimmt. Dies war die methodische Voraussetzung für den nachfolgenden Neutralisationstest (s. 3.6). Der Objektivierung der mikroskopisch beobachteten Entwicklung des zytopathischen Effektes diente der RSV-Antigennachweis im ELISA. Die mit 100 000 TCID50/100µl höchste TCID50 zeigte das RSV-Isolat 5138/1996, gefolgt von 1365/2007 mit 10 000 TCID50/100µl, einem RSV-B-Isolat. Die beiden RSV-A-Isolate 4849 und 7497 aus dem Jahr 2001 erreichten eine TCID50 von 1000 TCID50/100µl. Bei allen anderen RSV-Wildisolaten ließ sich das Antigen nur bis zu einem TCID50-Wert von 100 TCID50/100µl bzw. 10 TCID50/100µl nachweisen.

3.6 Neutralisationstest

Im Neutralisationstest wurden zunächst 16 Virusisolate mit jedem einzelnen monoklonalen Antikörper und mit den Antikörpern Synagis[®] sowie Serotec getestet. Es zeigte sich, dass nur die RSV-F-Antikörper Synagis[®] und 47F konstant alle Isolate neutralisierten. Serotec neutralisierte die RSV-Isolate 5138/1996 und 4615/2000 partiell und 33406/2006 sowie 1365/2007 vollständig. Eine partielle Neutralisation zeigten auch 2F mit dem Wildisolat 4849/2001 sowie 101F mit 2363/2003 und 1365/2007. Der zuletzt genannte Antikörper verhinderte außerdem das Wachstum der Isolate 3027/1999 und 3368/2004, welche der Subgruppe B zugehören.

Im Folgenden wurden Mixturen der monoklonalen Antikörper verwendet (85). Wie schon im vorherigen Versuch, neutralisierte 47F alle RSV-Isolate. Mit der Kombination aus 2F und 101F konnten 12 Isolate partiell neutralisiert werden. Die Mischung aus 021/2G und 68G zeigte eine partielle Neutralisation der beiden im Jahr 2005 isolierten Viren 2589 und 6122 sowie des Typ B Isolats 3027/1999. Serum 6, bestehend aus 021/1G, 021/21G, 021/2G, 021/19G, 59G, 63G sowie 68G, hemmte in geringem Ausmaß das Wachstum der Isolate 2589/2005, 6122/2005, 40911/2006 sowie 10615/2007. Der Antikörperpool 7 mit 021/5G, 021/7G, 021/8G und 021/9G neutralisierte nur 10615/2007 partiell.

Spezifität	Epitop-Kategorie	Monoklonaler Antikörper	Reaktivität mit RSV-Isolaten																			
			Subtyp A																			
			Long	5138/96	3224/00	4615/00	4803/01	4849/01	7497/01	2363/03	3287/03	3318/04	31867/04	2589/05	6122/05	33406/06	38309/06	40911/06	10615/07			12076/08
Anti-F		Serotec	[Heatmap showing reactivity patterns for Serotec, 2F, 47F, and 101F antibodies across various RSV isolates]																	ELISA-Reaktivität		
		2F																				
		47F																				
		101F																				
Anti-G	konserviert	021/1G	[Heatmap showing reactivity patterns for various RSV-G isolates]																	ELISA-Reaktivität		
		021/21G																				
	Gruppen-spezifisch	021/2G																				
		021/19G																				
	Stamm-spezifisch	021/5G																				
		021/7G																				
		021/8G																				
		021/9G																				
	nicht klassifiziert	59G																				
		63G																				
68G																						
	Anzahl der nicht-reaktiven Mabs	5	3	3	1	2	2	6	6	4	4	5	4	7	2	7	6	6	7	4		
Anti-F		2F + 101F	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	(+)	n.d.	n.d.	Neutralisation	
		47F	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	n.d.		n.d.
Anti-G		021/1G	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	
		021/21G	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	
		Pool 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	n.d.	n.d.	
		Pool 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	n.d.	n.d.	
		Pool 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	n.d.	n.d.	
Genotyp		GA1	GA5	GA2	GA5	GA5	GA5	GA5	GA5	GA5	GA2	GA2	GA2	GA2	GA2	GA2	GA2	GA2	GA2	GA2	GA2	

Abb. 13: **Reaktivität der RSV-Antikörper mit RSV-A-Isolaten im ELISA und Neutralisationstest:** schwarz: Reaktivität, grau: Partialreaktivität, weiß: keine Reaktivität; * in Anlehnung an Martinez et al. (84) und Garcia et al. (51)

Spezifität	Epitop-Kategorie	Monoklonaler Antikörper	Reaktivität mit RSV-Isolaten					ELISA-Reaktivität	
			Gruppe B						
			3027/99	211/02	3368/04	1365/07	4617/07		
Anti-F		Serotec 2F 47F 101F	■	■	■	■	■	ELISA-Reaktivität	
	„Konserviert“*	021/1G 021/21G	■	■	■	■	■		
		„Gruppen-spezifisch“*	021/2G 021/19G	■	■	■	■		■
Anti-G	„Stamm-spezifisch“*	021/5G 021/7G 021/8G 021/9G	■	■	■	■	■		
		„nicht-klassifiziert“*	59G 63G 68G	■	■	■	■		■
				8	9	6	10		8
			Anzahl der nicht-reaktiven Mabs						

Anti-F		2F + 101F 47F	(+)	(+)	(+)	(+)	-	Neutralisation
	Anti-G	021/1G 021/21G	-	-	-	-	-	
		Pool 5	(+)	-	-	-	-	
Pool 6		-	-	-	-	-		
Pool 7		-	-	-	-	-		

Abb.14: **Reaktivität der RSV-Antikörper mit RSV-B-Isolaten** im ELISA und Neutralisationstest (Erläuterung s. Abb. 13)

3.7 Antikörper-Enhancement

Die monoklonalen Antikörper 021/1G und 021/21G wurden auf das Vorhandensein eines Antikörper-*Enhancements* hin überprüft (s. 2.12). Der sich entwickelnde CPE wurde täglich mikroskopisch beurteilt. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben mit Antikörpern und der Kontrolle, zu der lediglich DMEM hinzugegeben wurde, erkennen. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurden die täglich entnommenen Proben in der quantitativen *Real-time PCR* getestet. Auch in der PCR ließ sich keine signifikante Verstärkung des Viruswachstums durch die Antikörper im Vergleich zur Kontrolle erkennen, sodass der Effekt des Antikörper-*Enhancements* durch 021/1G und 021/21G nicht nachgewiesen werden konnte. Vermutlich enthielten die Zellkulturüberstände verschiedene Konzentrationen an Antikörpern, sodass das Viruswachstum im Neutralisationstest in unterschiedlicher Weise beeinflusst wurde.

4 Diskussion

4.1 Dominanz der RSV-Genotypen

Das Respiratorische Synzytialvirus zeichnet sich durch ein hohes Maß an genetischer und antigenetischer Variabilität aus. Dies bedingt die hohe Rate an Reinfektionen und erschwert die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes. Um Hinweise auf das Vorliegen eines Antigendrifts zu finden, untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit 23 RSV-Wildisolate der Jahre 1996 bis 2008, welche zufällig aus einer Reihe von Routineproben der Universitätsklinik Düsseldorf ausgewählt wurden. Dabei fehlten Isolate der Jahre 1997-1999.

Bislang konnten acht verschiedene RSV-A Genotypen (GA1 bis GA7, South Africa A1) identifiziert werden (107,139). Respiratorische Synzytialviren unterschiedlicher Abstammung und verschiedener Genotypen kozirkulieren, ähnlich wie Influenza B Viren, während einer Saison (48,67,68,148). In der vorliegenden Arbeit konnten die verwendeten Virusisolate der Jahre 1996 bis 2003, mit Ausnahme von 3224/2000, dem Genotyp A5 zugeordnet werden, dann erfolgte ein Wechsel zum Genotyp A2. Obwohl aus den Jahren 2000 und 2006 RSV-Isolate beider Genotypen vertreten sind, wird der Aspekt der Kozirkulation nicht deutlich, was vermutlich durch die geringe Anzahl an Virusisolaten erklärt werden kann.

Die Dominanz der Genotypen A5 und A2 im Zeitraum 1996 bis 2008 findet sich auch in anderen Studien aus unterschiedlichen Ländern. So untersuchten Reiche et al. 1400 RSV-Isolate der Jahre 1998 bis 2007 aus Deutschland und sequenzierten 221 der RSV-A-Isolate (113). Dabei ließen sich 33% dem Genotyp GA2 zuordnen, 62% dem Genotyp GA5 und 12% dem Genotyp GA7, wobei GA5 der vorherrschende Genotyp der Jahre 1999 bis 2007 war. Der Genotyp GA7 zirkulierte in den Jahren 1999/2000 und 2002/2003. In der vorliegenden Arbeit fehlen Virusisolate des Jahres 1999, was, neben der vergleichsweise geringen Anzahl an untersuchten Isolat, erklären kann, dass sich keine Respiratorischen Synzytialviren des Genotyps GA7 fanden. Eine weitere Studie aus Indien konnte eine Dominanz des Genotyps GA5 in den Jahren 2003/2004 nachweisen, während zwischen 2002/2003 GA2 und GA5, sowie zwischen 2004/2005 GA5 und ein RSV-B-Isolat kozirkulierten (104). Ähnliche Ergebnisse erzielten Sato et al. in Japan, wobei sie im Zeitraum von 2001 bis 2004 lediglich 0,4% GA2 Isolate nachweisen konnten (122). Auch eine Studie aus Belgien ergab die Dominanz der Genotypen GA2 und GA5, neben einigen RSV-B-Isolaten, in den Jahren 1996 bis 2006 (152).

Allen Studien gemeinsam ist die Tatsache, dass die RSV Subgruppe A während der überwiegenden Anzahl an Epidemien gegenüber der Subgruppe B überwiegt. Ferner scheinen Reinfektionen nach einer Infektion mit RSV-A häufiger aufzutreten, als nach einer Infektion mit RSV-B (94), was auf Unterschiede in der genetischen Variabilität der verschiedenen RSV-Subgruppen und möglicherweise auch der Genotypen hinweist. Ob sich dies auch auf den Krankheitsverlauf auswirkt, ist bislang nicht abschließend geklärt (141).

4.2 Glykosylierungssequenzen des RSV-G-Proteins

Das RSV-G-Protein ist in hohem Maße glykosyliert (144). Die Variabilität in den Glykosylierungssequenzen scheint Einfluss auf die Reaktion des Respiratorischen Synzytialvirus mit Antikörpern zu nehmen und könnte es dem Virus ermöglichen, der Immunreaktion durch vorbestehende Antikörper zu entgehen (20,113).

Bereits im Jahr 1985 beschrieben Satake et al. sieben potentielle N-Glykosylierungssequenzen im C-terminalen Ende des G-Proteins eines RSV-Isolats des Genotyps A2 (121). Zwei dieser N-Glykosylierungsstellen waren bei allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Wildisolaten konserviert (Aminosäuren 85-87 und 251-253). Die Glykosylierungssequenzen im Bereich der Aminosäurereste 103-105, 135-137 sowie 237-239 ließen sich nicht bei allen Virusisolaten unserer Studie nachweisen (s. 3.3), diejenigen an Positionen 179-281 und 273-275 fehlten vollständig.

Auch Johnson et al. beschrieben in der Untersuchung von drei RSV-Isolaten (RSV-Long, -A2 und ein RSV-B-Isolat) 11 mögliche N-Glykosylierungssequenzen (72), darunter alle in der vorliegenden Arbeit gefundenen, mit Ausnahme der Bindungsstelle an Position 244 der Aminosäuresequenz.

Roca et al. sequenzierten das C-terminale Ende des G-Proteins von 10 RSV-A- und 20 RSV-B-Isolaten der Jahre 1998 und 1999 aus Mozambique (116). Sie fanden vier mögliche N-Glykosylierungsstellen bei den RSV-A-Isolaten an den Positionen 237-239, 250-252, 251-253 sowie 294-296, wobei diejenigen an den Aminosäureresten 237 sowie 294 konserviert waren. Im Unterschied dazu fehlte die N-Glykosylierungssequenz an Position 237-239 bei sieben der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Wildisolate aus den Jahren 2003 bis 2008 (s. 3.3).

Des Weiteren konnten Roca et al. fünf Wiederholungen des O-Glykosylierungsmotivs Lysin-Prolin- X_n -Threonin-Threonin-Lysin- X_n bei den Virusisolaten des Subtyps A nachweisen. Zwei davon (Aminosäurereste 201-212 sowie 216-221) waren sowohl bei den in der Studie von Roca et al. verwendeten Virusisolaten als auch bei den in der vorliegenden Arbeit

getesteten konserviert. Die Glykosylierungssequenz der Aminosäurereste 221-229 fehlte dem Isolat Moz/170/99 der genannten Studie, da es an Position 228 Alanin statt Threonin aufwies. Dies entspricht dem in unserer Arbeit getesteten Virusisolat 2363/2003, wobei die Mutation hier an Position 227 erfolgte. Das O-Glykosylierungsmotiv im Bereich der Aminosäuren 233 bis 240 war ebenfalls nicht konserviert: Durch eine Mutation des Aminosäurerests 233 (Lysin zu Glutamat) ließ es sich weder bei den Isolaten des Genotyps A2 der Studie von Roca et al., noch bei dem RSV Long Strain, der in den vorliegenden Experimenten verwendet wurde, nachweisen. Schließlich zeigten die von Roca et al. beschriebenen Isolate des Genotyps A2, ebenso wie die in Düsseldorf isolierten Respiratorischen Synzytialviren des Subtyps GA5 (mit Ausnahme des Isolats 40911/2006), einen Verlust der Glykosylierungssequenz der Aminosäuren 233 bis 240 durch eine Mutation an Position 238 (Isoleucin statt Threonin).

Das Glykosylierungsmuster des G-Proteins scheint einen Einfluss auf die Reaktivität des Virus mit Antikörpern zu nehmen. Palomo et al. testeten 18 monoklonale Antikörper mit unterschiedlich glykosylierten RSV-G-Proteinen im Westernblot, darunter drei Antikörper, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden (59G, 63G, 68G) (101). Alle Antikörper reagierten mit der vollständig glykosylierten Form des Proteins und nur die Antikörper 25G, 61G sowie 68G zeigten Reaktivitätsausfälle mit einer Form des G-Proteins, die ausschließlich O-glykosyliert war. Lediglich fünf der Antikörper reagierten hingegen mit einem G-Protein, dem die O-Glykosylierung fehlte (25G, 62G, 63G, 68G, 78G). Die monoklonalen Antikörper 25G, 26G, 63G, 74G sowie 77G reagierten auch mit der unglykosylierten Vorläuferform des Proteins. García-Beato et al. beschrieben ebenfalls, dass die Antikörper 63G, 021/5G und 021/9G auch mit der unglykosylierten Form des RSV-G-Proteins reagierten (53). Bei den vorliegenden Experimenten ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Reaktivitätsmuster der oben genannten Antikörper und den Glykosylierungssequenzen erkennen. Auffallend waren jedoch die vielen Reaktivitätsausfälle des RSV-Isolats 2363/2003, welches mit sieben monoklonalen Antikörpern im *ELISA* nicht reagierte (s. Abb. 14). Diesem Virusisolat fehlen zwei O-Glykosylierungsmuster im Bereich der Aminosäuren 221-229 und 233-240 sowie eine potentielle N-glykosidische Bindungsstelle an den Aminosäureresten 237-239. Diese Ergebnisse können als Hinweis darauf gedeutet werden, dass das Glykosylierungsmuster des RSV-G-Proteins die Reaktivität mit Antikörpern entscheidend beeinflusst.

Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen dem Reaktivitätsmuster des Antikörpers 021/8G mit den in Düsseldorf isolierten Respiratorischen Synzytialviren im *ELISA* und dem N-Glykosylierungsmuster der entsprechenden G-Proteine

beobachtet werden: Dieser Antikörper reagierte nicht mit den Virusisolaten 2363/2003, 3287/2003, 33406/2006, 38309/2006, 10615/2007, 12076/2008 sowie 12653/2008. Alle diese RSV-Wildisolate zeigten eine Mutation der potentiellen N-Glykosylierungssequenz im Bereich der Aminosäuren 237-239 (Aspartat bzw. Isoleucin statt Asparagin, s. Abb. 11). Dies unterstützt die Hypothese, dass die Reaktivität mit Antikörpern von dem Glykosylierungsmuster des G-Proteins abhängig sein könnte. Die oben genannte Mutation beschrieben auch Reiche et al., wobei diese Arbeitsgruppe die Mutation nur bei einem von 20 GA2 Isolaten und bei keinem GA5 Isolat fand (113).

Auffallend ist außerdem, dass vor allem die jüngeren Virusisolate Mutationen in den N-Glykosylierungssequenzen aufwiesen. So fehlte die potentielle N-glykosidische Bindungsstelle an Position 237-239 bei allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Respiratorischen Synzytialviren, die in den Jahren 2006 bis 2008 isoliert wurden, mit Ausnahme des Isolats 40911/2006 (s. Abb. 11). Die N-Glykosylierungssequenz im Bereich der Aminosäurereste 103-105 fehlte den drei jüngsten Wildisolaten (10615/2007, 12076/2008, 12653/2008) durch eine Mutation von Leucin zu Prolin. Dies kann als Hinweis auf das Vorliegen von systematischen, progressiven Mutationen im Sinne eines Antigen drifts gewertet werden. Zlateva et al. untersuchten in einer Studie 112 RSV-A-Isolate aus den Jahren 1984 bis 2002 (151). Sie konnten mit Hilfe des Quotienten aus nichtsynonymen zu synonymen Mutationen sowie des sog. *Likelihood*-Verfahrens 13 Regionen ermitteln, die vermutlich einem positiven Selektionsdruck unterliegen, darunter auch einige potentielle O-Glykosylierungsstellen (Serin- und Threoninreste). Allerdings beschrieben sie keine progressiven Mutationen in den Bereichen der Aminosäuresequenzen, die eine extensive O-Glykosylierung ermöglichen.

Weiterhin zeigten sich drei möglicherweise genotypspezifische potentielle O-glykosidische Bindungsstellen. Alle in der vorliegenden Arbeit getesteten RSV-Isolate des Genotyps GA2 zeichneten sich durch die Aminosäure Threonin an Position 241 aus, wie bereits Reiche und Schweiger beschrieben (113). Den Ergebnissen der genannten Studie entsprechend, wiesen alle RSV-Wildisolate des Genotyps GA5 die Aminosäure Threonin an Position 274 und zusätzlich Serin an Position 251 auf. Schließlich ergaben die Experimente einen signifikanten Unterschied bei der Anzahl der potentiellen O-Glykosylierungssequenzen zwischen den RSV-Genotypen, wobei die Isolate des Genotyps GA2 in höherem Maße glykosyliert zu sein scheinen, als diejenigen des Genotyps GA5. Um dies zu bestätigen, müsste eine größere Anzahl an Proben untersucht werden.

4.3 Hinweise auf das Vorliegen einer Immunselektion

Das RSV-G-Protein weist ein hohes Maß an genetischer und antigenetischer Variabilität auf (8,33,52,95). Cane et al. beschrieben 1991 eine Häufung von Aminosäuresubstitutionen im Bereich der beiden muzinähnlichen Regionen in der Ektodomäne des RSV-G-Proteins (20). Dies ließ sich auch in den vorliegenden Experimenten nachweisen: Während die ds/dn-ratio des gesamten RSV-G-Proteins 2,183 betrug, variierten die Werte in den muzinähnlichen Regionen zwischen 1,02 und 1,62, wobei ein niedriger Wert auf einen positiven Selektionsdruck hinweist. Reiche et al. beschrieben eine höhere Rate an nichtsynonymen Mutationen bei RSV-GA2 Isolaten (ds/dn=1.18) als bei RSV-GA5-Isolaten (ds/dn=4.34) (113), ein Ergebnis, welches in der vorliegenden Arbeit, möglicherweise auf Grund der geringen Probenanzahl, nicht nachvollzogen werden kann. Die Tatsache, dass das RSV-G-Protein ein höheres Maß an Aminosäuredivergenz als an Nukleotiddivergenz aufweist, könnte eine Ursache dafür sein, dass das Virus der Immunreaktion des Körpers entkommt und stellt möglicherweise einen Erklärungsansatz dafür dar, dass die RSV-Isolate für mehrere, zum Teil aufeinander folgende Epidemien, sowie für Reinfektionen, verantwortlich sind.

García et al. untersuchten 1994 76 RSV-Isolate der Subgruppe A aus Madrid und Montevideo und verglichen die Reaktivität der Wildisolate mit monoklonalen G-Antikörpern mit der genetischen Variabilität der G-Proteine (51). Sie beschrieben einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Position der RSV-Isolate im Stammbaum und ihrer Reaktivität mit den Antikörpern, wobei jüngere Isolate mit weniger Antikörpern reagierten als ältere und deuteten dies als möglichen Antigendrift, wie er bei Influenza B Viren auftritt. In der vorliegenden Arbeit korreliert der Reaktivitätsverlust im ELISA zwar ebenfalls mit dem Jahr der Virusisolierung, jedoch kann aus dem Reaktivitätsverlust einzelner Antikörpergruppen nicht auf die Position der Viren im Stammbaum geschlossen werden.

Ähnliche Ergebnisse wie García et al. erzielten auch Cane und Pringle (22). Sie sequenzierten die Nukleotide 283 bis 411 sowie 799 bis 917 der G-Proteine von 48 Respiratorischen Synzytialviren aus verschiedenen Ländern, die im Laufe von 38 Jahren isoliert wurden, und testeten die Viren mit den monoklonalen Antikörpern 021/1G, 021/2G, 021/5G, 021/8G, 25G, 63G sowie 68G, die mit Ausnahme von 25G auch in unseren Experimenten verwendet wurden. Die Position der Virusisolate im Stammbaum war abhängig von dem Jahr der Isolierung. So fanden sich ältere Isolate eher in der Nähe des Stammes, jüngere in der Peripherie. Außerdem konnten Cane und Pringle einen Zusammenhang zwischen der Reaktivität der RSV-Wildisolate mit den monoklonalen Antikörpern und der Position im

Stammbaum feststellen, wobei wiederum jüngere Isolate mit weniger Antikörpern reagierten als ältere. Eine Ausnahme bildeten die beiden Antikörper 021/1G und 021/2G, die mit allen Virusisolaten reagierten. Cane und Pringle interpretierten diesen zunehmenden Reaktivitätsverlust als möglichen Antigendrift. Diese These unterstützten sie durch die Beobachtung, dass, wie bei Influenza B, mehr nichtsynonyme als synonyme Mutationen auf Nukleotidebene auftraten, was durch einen positiven Selektionsdruck erklärt werden könne. Schließlich beschrieben Cane und Pringle eine Akkumulationsrate der Aminosäureveränderungen in den sequenzierten Abschnitten des G-Proteins von 0,5 bis 1% pro Jahr. Die Berechnung einer solchen Akkumulationsrate wäre in der vorliegenden Arbeit auf Grund der geringen Anzahl an Virusisolaten nicht aussagekräftig.

In einer ähnlichen Studie konnten schließlich auch Arbiza et al. Hinweise auf einen Antigendrift und auf eine Form der Epidemiologie, die der von Influenza B entspricht, beschreiben (10). Sie untersuchten jeweils 37 RSV-Isolate der Gruppen A und B aus 17 Jahren in Montevideo und konnten neben der Kozirkulation eine Kumulation von Mutationen feststellen, die auch auf Proteinebene in Form von Aminosäuresubstitutionen erkennbar war.

Im Gegensatz zu den oben genannten Studien konnten Zheng et al. einen Antigendrift nicht nachweisen (149). Sie verglichen drei Gruppen von RSV-Isolaten miteinander, indem sie die Oberflächenproteine sequenzierten und Stammbäume erstellten. Sie vermuteten, bei der ersten Gruppe, der sieben in fünf aufeinanderfolgenden Jahren in St. Louis isolierte Respiratorische Synzytialviren zugeteilt waren, einen Antigendrift zu beobachten. In der Gruppe 2 waren vier Virusisolate aus unterschiedlichen Jahren und Orten zusammengefasst, die auf G-Proteinebene einen hohen Grad an Übereinstimmung zu den Isolaten der Gruppe eins aufwiesen. Gruppe 3 enthielt vier RSV-Isolate, die sich in ihren G-Protein-Sequenzen deutlich von denen der anderen beiden Gruppen unterschieden. Diese beiden Gruppen sollten als eine Art Negativprobe dienen, bei denen kein Antigendrift zu erwarten sei. Zheng et al. konnten jedoch keine Kumulation der Mutationen auf Nukleotidebene in der Gruppe 1 feststellen. Es muss jedoch bedacht werden, dass in dieser Studie lediglich sieben Virusisolate miteinander verglichen wurden, sodass ein signifikantes Ergebnis nicht erwartet werden konnte. Zudem erfolgte in dieser Arbeit lediglich eine genetische Untersuchung der Virusisolate, nicht jedoch eine antigenetische.

Zheng et al. fanden in ihrer Studie jedoch Hinweise auf das Vorliegen eines Antigen-Shifts (149) bei dem RSV-Isolat SL11, welches der Gruppe 1 angehörte. In den Sequenzen der F-, G-, M- und M2-Gene zeigte es wie erwartet einen hohen Grad an Übereinstimmungen mit den

anderen Isolaten der Gruppe 1 und denen der Gruppe 2. Das SH-Gen hingegen ähnelte in seiner Sequenz sehr den Wildisolaten der Gruppe 3, bei einigen Sequenzabschnitten ließ sich keine Übereinstimmung zu den anderen Viren erkennen. Es ist jedoch bekannt, dass sich die Ektodomäne des SH-Proteins durch eine hohe Variabilität in der Sequenz auszeichnet (26). Schließlich gilt auch hier zu bedenken, dass nur eine sehr geringe, nicht repräsentative Anzahl an Virusisolaten miteinander verglichen wurden.

4.4 Neutralisation durch monoklonale Anti-RSV-G-Antikörper

Da viele der gegen RSV gerichteten Antikörper vermutlich an Konformationsepitope binden, erfolgte neben der Sequenzanalyse die Untersuchung der Viruswildisolate mit monoklonalen Antikörpern, um weitere Hinweise auf das Vorliegen eines Antigendrifts zu erhalten.

4.4.1 Einteilung in Subgruppen- und gruppenspezifische Antikörper

Martínez et al. und García et al. beschrieben die Zuordnung der Anti-RSV-G-Antikörper zu drei verschiedenen Gruppen: Während 021/1G und 021/21G konservierte Epitope erkennen, binden die Antikörper 021/2G und 021/19G in gruppenspezifischen Regionen des Proteins. 021/5G, 021/7G, 021/8G sowie 021/9G reagieren hingegen mit variablen Epitopen des G-Proteins (51,84). Der Antikörper 63G könnte der letzten Gruppe angehören, da er im *ELISA* sowohl mit RSV-Isolaten des Subtyps A als auch mit denen des Subtyps B reagierte, jedoch auch zahlreiche Ausfälle zeigte (52).

Die Ergebnisse des *ELISAs*, in dem 23 RSV-Wildisolate mit den monoklonalen Antikörpern getestet wurden, bestätigen weitestgehend die Annahme, dass die beiden Antikörper 021/1G sowie 021/21 G konservierte Epitope erkennen. Zwar zeigten sie mit dem Isolat 6122/2005 lediglich eine partielle Aktivität, es kam jedoch zu keinen weiteren Reaktivitätsausfällen.

Die Beschreibung der Antikörper 021/2G und 021/19G als gruppenspezifisch ließ sich hingegen nicht nachvollziehen: 021/2G reagierte nicht mit allen RSV-Wildisolaten der Subgruppe A, wobei ein deutlicher Abfall der Reaktivität mit jüngeren Isolaten aus den Jahren 2006 und 2007 erkennbar war. Stattdessen reagierte er jedoch mit den RSV-Isolaten 3027 aus dem Jahr 1999 und 3368 aus 2004, welche der Subgruppe B angehören. Der monoklonale Antikörper 021/19G reagierte mit allen Wildisolaten der Gruppe A, jedoch auch mit dem Isolat 4617/2007, sowie partiell mit den Isolaten 211/2002, 3368/2004 und 1365/2007 der Subgruppe B. Martínez et al. beobachteten ebenfalls eine Partialaktivität dieses Antikörpers mit RSV-B-Isolaten (84).

Bei den stammspezifischen Antikörpern ließ sich eine zunehmende Abnahme der Reaktivität im Laufe der Jahre erkennen. Eine Ausnahme bildet der Antikörper 021/7G, welcher schon mit denen in den Jahren 1996 bis 2000 isolierten Viren nicht reagiert. Eine Korrelation zwischen dem RSV-Genotyp und der Reaktivität mit den Antikörpern ist nicht ersichtlich.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass sich die Gruppen- bzw. Stammspezifität der monoklonalen Antikörper in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigte, ist die Tatsache, dass diese gegen das im Jahre 1988 isolierte Respiratorische Synzytialvirus Mon/3/88 generiert wurden (84), wohingegen die hier getesteten Wildisolate in den Jahren 1996 bis 2008 isoliert wurden und somit acht Jahre und jünger als Mon/3/88 sind. In dieser Zeitspanne könnten sich die Epitope so verändert haben, dass die Antikörper nicht mehr zur Typisierung genutzt werden können. Dies wird unterstützt durch die Reaktivitätsscores der Anti-RSV-G-Antikörper, welche eine signifikante negative Korrelation mit dem Jahr der Virusisolierung aufwiesen und damit auf einen positiven Selektionsdruck hinweisen. Schließlich deutet auch die Tatsache, dass sich in der vorliegenden Arbeit bei vier Wildisolaten Mutationen nachweisen ließen, die zuvor nur bei *in vitro Escapemutanten* auftraten (22), auf eine Immunselektion hin.

4.4.2 Wirkung von Antikörper-Cocktails

Da die RSV-G-Antikörper im Einzelnen nur eine geringe bzw. keine Neutralisation der RSV-Wildisolate zeigten, wurden sie im Cocktail getestet. Anderson et al. stellten bereits im Jahre 1988 fest, dass durch die Kombination von RSV-F-Antikörpern, welche das Virus komplett neutralisierten, mit RSV-G-Antikörpern, die keine oder nur eine partielle Neutralisation zeigten, die Wirkung der Antikörper bis hin zu einer kompletten Neutralisation gesteigert werden konnten (7). Vermutlich beruhte bei diesen Experimenten der neutralisierende Effekt jedoch vor allem auf den RSV-F-Antikörpern.

Martínez et al. testeten hingegen Kombinationen aus RSV-G-Antikörpern, die größtenteils auch in den vorliegenden Experimenten verwendet wurden (85), im Mikroneutralisationstest mit dem RSV Long strain. Sie erzielten die besten Ergebnisse durch Kombination von Antikörpern aller drei Subgruppen (s. 2.8.2.1 und 4.4.1). Das hier getestete Serum 6 enthält Antikörper, die konservierte Epitope erkennen (021/1G und 021/21G) sowie gruppenspezifische (021/2G und 021/19G) und nicht klassifizierte Antikörper (s. 2.11.2). Die Gruppe der stammspezifischen Antikörper ist in der Mixtur nicht vertreten. Mit diesem Cocktail ließ sich lediglich eine partielle Neutralisation der RSV-Wildtypen 2589/05, 6122/05, 40911/06 und 10615/07 erreichen (s.3.6).

Signifikante Ergebnisse erhielten Martínez et al. ferner durch die Kombination des Antikörpers 59G mit 021/1G, 021/2G, 63G oder 68G (85). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Mixturen aus zwei Antikörpern nicht getestet, jedoch enthält das Serum 6 alle von Martínez et al. genannten Antikörper, sodass man einen stärkeren neutralisierenden Effekt erwarten könnte. Dies ließ sich, wie oben beschrieben, entgegen der Vermutung nicht belegen (s.3.6). Auch konnten Martínez et al. eine verstärkte Neutralisation durch einen Antikörpercocktail, bestehend aus 021/1G, 021/2G, 63G sowie 64G, erzielen (85). Mit Ausnahme des Antikörpers 64G sind diese wiederum im getesteten Serum 6 enthalten.

Möglicherweise lässt sich die in der vorliegenden Arbeit fehlende signifikante Neutralisation durch Antikörper-Mixturen dadurch erklären, dass hier RSV-Wildtypen getestet wurden, wohingegen Martínez et al. den im Jahre 1956 isolierten Laborstamm RSV Long strain verwendeten, gegen den die Antikörper 59G, 63G und 68G produziert wurden. Die Epitope der Wildisolate könnten sich im Verlauf der Jahre so stark verändert haben, dass die Antikörper keinen signifikanten neutralisierenden Effekt mehr ausüben können.

Ein anderer Erklärungsansatz für die fehlende Verstärkung der Neutralisation ist, dass einige der verwendeten Antikörper möglicherweise miteinander um ein Epitop konkurrieren, und so keinen synergistischen Effekt haben können. García-Barreno et al. beschrieben 1989, dass der in der vorliegenden Arbeit getestete Antikörper 59G mit einigen anderen Antikörpern konkurriert, nicht jedoch mit 63G und 68G (52), sodass dies nicht erklärt, warum das Serum 6 keine stärkeren neutralisierenden Effekt hat. Um eine genauere Aussage treffen zu können, müsste getestet werden, inwieweit die gegen das RSV-Isolat Mon/3/88 generierten Antikörper um die Bindung an ein Epitop konkurrieren.

4.5 Neutralisation von RSV-Wildisolaten durch Synagis®

Im Jahre 1999 wurde in Europa der monoklonale RSV-F-Antikörper Synagis® (bzw. Palivizumab) zur Prophylaxe einer RSV-Infektion zugelassen (142). Dieser humanisierte murine Antikörper der Subklasse IgG-1 wird Kindern mit einem hohen Risiko für eine schwer verlaufende RSV-Infektion einmal monatlich intramuskulär injiziert (1). Die „IMpact-RSV Study Group“ konnte in einer randomisierten, doppelblind geführten und Placebo-kontrollierten Studie die klinische Wirksamkeit der Prophylaxe mit Palivizumab belegen. In 139 Zentren wurden 1502 Kinder mit Risikofaktoren für eine schwer verlaufende RSV-Infektion rekrutiert. Die 1002 der Verumgruppe zugeteilten Kinder erhielten fünf monatliche Antikörper-Injektionen. In der Nachbeobachtungszeit von insgesamt 150 Tagen zeigte sich

eine hoch signifikante Reduktion der Krankenhausaufenthalte auf Grund einer RSV-Infektion um 55% in der Verumgruppe (1).

Johnson et al. konnten 1997 im Tiermodell die Wirksamkeit des Antikörpers gegen Virusisolate beider RSV-Subgruppen nachweisen. Dabei wurde Synagis[®] mit 57 klinischen Isolaten im Neutralisationstest, „*Plaque-reduction assay*“ sowie im „*fusion-inhibition assay*“ getestet (73). Es zeigte sich eine dosisabhängige Neutralisation der Infektion, die Virusproduktion wurde auch bei Mehrfachanwendung des Medikaments nicht erhöht (109). In der vorliegenden Arbeit wurde Synagis[®] im Neutralisationstest mit 23 in Düsseldorf isolierten RSV-Wildtypen getestet. Dabei bestätigte sich die konstante Wirksamkeit des Antikörpers auch in höheren Verdünnungsstufen.

Um zu überprüfen, ob die mehrfache Anwendung von Palivizumab eine Resistenzbildung begünstigen könnte, isolierten Devincenzo et al. in acht amerikanischen Städten 371 RSV-Wildtypen von Kindern, die sich aufgrund einer RSV-Infektion zwischen 1998 und 2002 in stationärer Behandlung befanden. Unter diesen befanden sich 25 Patienten, die einer Prophylaxe mit Palivizumab unterzogen worden waren (35). Im Immunfluoreszenztest zeigte sich, dass der Antikörper auch diese Isolate binden konnte, sodass man vermuten kann, dass das Epitop, an welches Synagis[®] bindet, hochkonserviert ist und eine Behandlung mit dem Antikörper nicht innerhalb weniger Jahre zu Mutationen führt. Es ist nicht bekannt, ob eines der Kinder, von dem die in unseren Experimenten verwendeten RSV-Wildtypen isoliert wurden, zuvor eine Prophylaxe mit dem Medikament erhalten hatte, jedoch weisen auch unsere Ergebnisse darauf hin, dass Synagis[®] an ein sehr gut konserviertes Epitop bindet. Selbst Viren, die bis zu acht Jahre nach der Zulassung des Medikaments isoliert wurden, lassen sich durch Synagis[®] neutralisieren, obwohl es Hinweise gibt, dass die jüngeren Isolate Mutationen in zahlreichen Epitopen aufweisen.

4.6 RSV-B-G-Gen-Duplikation

Die beiden RSV-Wildisolate 4617/2007 und 1365/2007, welche dem Genotyp B zugeordnet werden konnten, waren durch eine aus 60 Nukleotiden bestehende Duplikation im Gen des G-Proteins gekennzeichnet (s. 3.1.3). Diese befand sich im Bereich der Basenpaare 751 bis 810. Eine solche Duplikation beschrieben Trento et al. erstmals 2003 bei drei in Buenos Aires 1999 isolierten RSV-B-Isolaten (136). Diese begann jedoch an Position 791. In den folgenden Jahren berichteten auch andere Arbeitsgruppen in Japan, Belgien und Kenia von 60-Nukleotid-Duplikationen (78,97,122,123,150). Die entsprechenden Virusisolate stammten aus den Jahren 1999 bis 2004. Trento et al. vermuteten nach phylogenetischen Untersuchungen,

dass sich all diese Isolate aus einem RSV-Wildisolat entwickelt haben könnten, welches vermutlich zwischen 1998 und 1999 zirkulierte (137). Die Sequenzen der beiden in der vorliegenden Arbeit beschriebenen RSV-B-Isolate müssten mit anderen Sequenzen, die ebenfalls eine solche Duplikation aufwiesen, verglichen werden, um eine Aussage über die Abstammung treffen zu können.

5 Schlussfolgerungen

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

- RSV-A-Isolate (n=18) der Jahre 1998-2008 konnten den Genotypen GA5 und GA2 zugeordnet werden. Dabei erfolgte ein Wechsel von GA5 zu GA2 im Jahr 2003, wie er auch von anderen Autoren beobachtet wurde.
- Das RSV-F-Protein ist weitestgehend konserviert. Dagegen fanden sich im G-Protein Bereiche von hoher Variabilität neben weitgehend konservierten Regionen.
- Die RSV-GA2-Isolate wiesen mehr potentielle O-glykosidische Bindungsstellen auf als die RSV-GA5-Isolate. Bei den jüngeren Virusisolaten ließ sich ein Verlust von N-Glykosylierungssequenzen feststellen, was als ein Hinweis auf das Vorliegen systematischer progressiver Mutationen gewertet werden kann.
- Bei als stammspezifisch klassifizierten monoklonalen Antikörpern ließ sich eine signifikante negative Korrelation der Reaktivität mit dem Herkunftsjahr des RSV feststellen, was auf einen positiven Immunselektionsdruck hinweist. Dies wird dadurch unterstützt, dass sich in der vorliegenden Arbeit bei vier Wildisolaten Mutationen fanden, die zuvor nur bei in vitro Escape-Mutanten beschrieben wurden.
- Die Testung der Isolate im Neutralisationstest ergab, dass der in der Prophylaxe eingesetzte Synagis[®]-Antikörper alle untersuchten RSV-Isolate neutralisieren konnte, was darauf hinweist, dass dieser Antikörper an ein stark konserviertes Epitop bindet. Dagegen neutralisierten die Antikörper, die gegen das RSV-G-Protein gerichtet sind, die Wildisolate gar nicht oder nur partiell.

Daraus ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- Die Immunselektion durch Antikörper im Sinne eines Antigendrifts ist bei der Evolution des humanen Respiratorischen Synzytialvirus ein entscheidender Faktor und stellt damit eine Ursache für die häufig im Leben auftretenden Reinfektionen dar.
- Der antigene Drift des RSV betrifft ganz wesentlich das RSV-G-Protein und lässt sich mit Hilfe von stammspezifischen monoklonalen Antikörpern und RSV-Isolaten aus verschiedenen zeitlichen Perioden nachweisen.

-
- Dieser Nachweis ist nur zu führen mit einem ganzen Panel an Antikörpern und der exakten qualitativen und quantitativen Auswertung ihrer Reaktivität.
 - Der in der RSV-Prophylaxe eingesetzte RSV-F-Antikörper (Synagis[®]) bindet konstant und hoch reaktiv an ein Epitop im F-Protein, das sich in allen Isolaten von 1998-2008 als konserviert erwiesen hat und deshalb als Zielregion für eine passive Immunisierung als ideal zu bezeichnen ist.

6 Literatur

Reference List

1. 1998. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMpact-RSV Study Group. *Pediatrics* **102**:531-537.
2. 1998. Prevention of respiratory syncytial virus infections: indications for the use of palivizumab and update on the use of RSV-IGIV. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee of Fetus and Newborn. *Pediatrics* **102**:1211-1216.
3. SNAP. 2011.
Ref Type: Online Source
4. Wikipedia. 2012.
Ref Type: Online Source
5. **Aherne, W., T. Bird, Court SD, P. S. Gardner, and J. McQuillin.** 1970. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J.Clin.Pathol.* **23**:7-18.
6. **Ahmadian, G., J. Randhawa, and A. Easton.** 2000. Expression of the ORF-2 protein of the human respiratory syncytial virus M2 gene is initiated by a ribosomal termination-dependent reinitiation mechanism. *EMBO J.* **19**:2681-2689.
7. **Anderson, L. J., P. Bingham, and J. C. Hierholzer.** 1988. Neutralization of respiratory syncytial virus by individual and mixtures of F and G protein monoclonal antibodies. *J.Virol.* **62**:4232-4238.
8. **Anderson, L. J., J. C. Hierholzer, C. Tsou, R. M. Hendry, B. F. Fernie, Y. Stone, and K. McIntosh.** 1985. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect.Dis.* **151**:626-633.
9. **Anderson, L. J., C. Tsou, C. Potter, H. L. Keyserling, T. F. Smith, G. Ananaba, and C. R. Bangham.** 1994. Cytokine response to respiratory syncytial virus stimulation of human peripheral blood mononuclear cells. *J.Infect.Dis.* **170**:1201-1208.
10. **Arbiza, J., A. Delfraro, and S. Frabasile.** 2005. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001--a review. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **100**:221-230.
11. **Atreya, P., M. E. Peeples, and P. L. Collins.** 1998. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *J Virol.* **72**:1452-1461.
12. **Barik, S., T. McLean, and L. C. Dupuy.** 1995. Phosphorylation of Ser232 directly regulates the transcriptional activity of the P protein of human respiratory syncytial virus: phosphorylation of Ser237 may play an accessory role. *Virology* **213**:405-412.

13. **Becker, S., J. Quay, and J. Soukup.** 1991. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J.Immunol.* **147**:4307-4312.
14. **Bergstrasser, E., R. Zbinden, C. Minder, and H. E. Gnehm.** 1998. [Severity of respiratory syncytial virus infection influenced by clinical risk factors and subtype A and B in hospitalized children]. *Klin.Padiatr.* **210**:418-421.
15. **Bermingham, A. and P. L. Collins.** 1999. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:11259-11264.
16. **Berthiaume, L., J. Joncas, and V. Pavilanis.** 1974. Comparative structure, morphogenesis and biological characteristics of the respiratory syncytial (RS) virus and the pneumonia virus of mice (PVM). *Arch.Gesamte Virusforsch.* **45**:39-51.
17. **Bresee, J. S., M. Fischer, S. F. Dowell, B. D. Johnston, V. M. Biggs, R. S. Levine, J. R. Lingappa, H. L. Keyserling, K. M. Petersen, J. R. Bak, H. E. Gary, Jr., A. L. Sowell, C. E. Rubens, and L. J. Anderson.** 1996. Vitamin A therapy for children with respiratory syncytial virus infection: a multicenter trial in the United States. *Pediatr.Infect.Dis.J.* **15**:777-782.
18. **Calder, L. J., L. Gonzalez-Reyes, B. Garcia-Barreno, S. A. Wharton, J. J. Skehel, D. C. Wiley, and J. A. Melero.** 2000. Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology* **271**:122-131.
19. **Cane, P. A.** 2001. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev.Med.Virol.* **11**:103-116.
20. **Cane, P. A., D. A. Matthews, and C. R. Pringle.** 1991. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. *J.Gen.Virol.* **72 (Pt 9)**:2091-2096.
21. **Cane, P. A. and C. R. Pringle.** 1991. Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleotide sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J Gen.Virol.* **72 (Pt 2)**:349-357.
22. **Cane, P. A. and C. R. Pringle.** 1995. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *J.Virol.* **69**:2918-2925.
23. **CHANOCK, R. M., Roizman B, and Myers R.** 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. I. Isolation, properties and characterization. *Am.J.Hyg.* **66**:281-290.
24. **Chiba, Y., Y. Higashidate, K. Suga, K. Honjo, H. Tsutsumi, and P. L. Ogra.** 1989. Development of cell-mediated cytotoxic immunity to respiratory syncytial virus in human infants following naturally acquired infection. *J.Med.Virol.* **28**:133-139.
25. **Coates, H. V., D. W. Alling, and R. M. CHANOCK.** 1966. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralisation test. *Am.J Epidemiol.* **83**:299-313.

26. **Collins, P. L., R. M. CHANOCK, and B. R. Murphy.** 2001. Respiratory Syncytial Virus, p. 1443-1485. *In*: B. N. Field, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. CHANOCK, T. P. Monath, J. L. Melnick, Roizman B, and S. E. Straus (eds.), *Fields' Virology*. Lippincott Williams & Wilkins.
27. **Collins, P. L., M. G. Hill, J. Cristina, and H. Grosfeld.** 1996. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **93**:81-85.
28. **Collins, P. L., M. G. Hill, and P. R. Johnson.** 1990. The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J Gen.Virol.* **71 (Pt 12)**:3015-3020.
29. **Collins, P. L. and G. Mottet.** 1991. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J.Gen.Virol.* **72 (Pt 12)**:3095-3101.
30. **Collins, P. L. and G. Mottet.** 1993. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *J Gen.Virol.* **74 (Pt 7)**:1445-1450.
31. **Collins, P. L., R. A. Olmsted, M. K. Spriggs, P. R. Johnson, and A. J. Buckler-White.** 1987. Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **84**:5134-5138.
32. **Connors, M., P. L. Collins, C. Y. Firestone, and B. R. Murphy.** 1991. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J.Virol.* **65**:1634-1637.
33. **Cristina, J., J. A. Lopez, C. Albo, B. Garcia-Barreno, J. Garcia, J. A. Melero, and A. Portela.** 1990. Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: subtype divergence and heterogeneity. *Virology* **174**:126-134.
34. **Crowe, J. E., Jr., P. T. Bui, C. Y. Firestone, M. Connors, W. R. Elkins, R. M. CHANOCK, and B. R. Murphy.** 1996. Live subgroup B respiratory syncytial virus vaccines that are attenuated, genetically stable, and immunogenic in rodents and nonhuman primates. *J.Infect.Dis.* **173**:829-839.
35. **Devincenzo, J. P., C. B. Hall, D. W. Kimberlin, P. J. Sanchez, W. J. Rodriguez, B. A. Jantusch, L. Corey, J. S. Kahn, J. A. Englund, J. A. Suzich, F. J. Palmer-Hill, L. Branco, S. Johnson, N. K. Patel, and F. M. Piazza.** 2004. Surveillance of clinical isolates of respiratory syncytial virus for palivizumab (Synagis)-resistant mutants. *J Infect.Dis.* **190**:975-978.
36. **Domurat, F., N. J. Roberts, Jr., E. E. Walsh, and R. Dagan.** 1985. Respiratory syncytial virus infection of human mononuclear leukocytes in vitro and in vivo. *J.Infect.Dis.* **152**:895-902.

37. **Evans, J. E., P. A. Cane, and C. R. Pringle.** 1996. Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res.* **43**:155-161. doi:0168170296013275 [pii].
38. **Everard, M. L., A. Swarbrick, M. Wraitham, J. McIntyre, C. Dunkley, P. D. James, H. F. Sewell, and A. D. Milner.** 1994. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. *Arch.Dis.Child* **71**:428-432.
39. **Falsey, A. R. and E. E. Walsh.** 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin.Microbiol.Rev.* **13**:371-384.
40. **Falsey, A. R. and E. E. Walsh.** 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly adults. *Drugs Aging* **22**:577-587.
41. **Fearns, R. and P. L. Collins.** 1999. Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. *J Virol.* **73**:388-397.
42. **Fearns, R. and P. L. Collins.** 1999. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol.* **73**:5852-5864.
43. **Fearns, R., P. L. Collins, and M. E. Peeples.** 2000. Functional analysis of the genomic and antigenomic promoters of human respiratory syncytial virus. *J.Virol.* **74**:6006-6014.
44. **Feldman, S. A., R. M. Hendry, and J. A. Beeler.** 1999. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J.Virol.* **73**:6610-6617.
45. **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
46. **Fiedler, M. A., K. Wernke-Dollries, and J. M. Stark.** 1995. Respiratory syncytial virus increases IL-8 gene expression and protein release in A549 cells. *Am.J.Physiol* **269**:L865-L872.
47. **Fodha, I., A. Vabret, L. Ghedira, H. Seboui, S. Chouchane, J. Dewar, N. Gueddiche, A. Trabelsi, N. Boujaafar, and F. Freymuth.** 2007. Respiratory syncytial virus infections in hospitalized infants: association between viral load, virus subgroup, and disease severity. *J.Med.Virol.* **79**:1951-1958. doi:10.1002/jmv.21026 [doi].
48. **Freymuth, F., J. Petitjean, P. Pothier, J. Brouard, and E. Norrby.** 1991. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups A and B in France from 1982 to 1990. *J.Clin.Microbiol.* **29**:653-655.
49. **Galiano, M. C., C. Palomo, C. M. Videla, J. Arbiza, J. A. Melero, and G. Carballal.** 2005. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). *J.Clin.Microbiol.* **43**:2266-2273.

50. **Garcia, J., B. Garcia-Barreno, A. Vivo, and J. A. Melero.** 1993. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* **195**:243-247.
51. **Garcia, O., M. Martin, J. Dopazo, J. Arbiza, S. Frabasile, J. Russi, M. Hortal, P. Perez-Brena, I. Martinez, B. Garcia-Barreno, and .** 1994. Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol.* **68**:5448-5459.
52. **Garcia-Barreno, B., C. Palomo, C. Penas, T. Delgado, P. Perez-Brena, and J. A. Melero.** 1989. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J.Virol.* **63**:925-932.
53. **Garcia-Beato, R., I. Martinez, C. Franci, F. X. Real, B. Garcia-Barreno, and J. A. Melero.** 1996. Host cell effect upon glycosylation and antigenicity of human respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Virology* **221**:301-309.
54. **Garofalo, R., J. L. Kimpen, R. C. Welliver, and P. L. Ogra.** 1992. Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection. *J.Pediatr.* **120**:28-32.
55. **Ghildyal, R., C. Hartley, A. Varrasso, J. Meanger, D. R. Voelker, E. M. Anders, and J. Mills.** 1999. Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity. *J.Infect.Dis.* **180**:2009-2013.
56. **Gorman, J. J., Ferguson BL, Speelman D, and et al.** 1997. Determination of the disulfide bond arrangement of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Sci* **6**:1308-1315.
57. **Gower, T. L., M. K. Pastey, M. E. Peeples, P. L. Collins, L. H. McCurdy, T. K. Hart, A. Guth, T. R. Johnson, and B. S. Graham.** 2005. RhoA signaling is required for respiratory syncytial virus-induced syncytium formation and filamentous virion morphology. *J.Virol.* **79**:5326-5336. doi:79/9/5326 [pii];10.1128/JVI.79.9.5326-5336.2005 [doi].
58. **Gruber, C. and S. Levine.** 1983. Respiratory syncytial virus polypeptides. III. The envelope-associated proteins. *J.Gen.Virol.* **64 (Pt 4)**:825-832.
59. **Hall, C. B., R. G. Douglas, Jr., J. M. Geiman, and M. K. Messner.** 1975. Nosocomial respiratory syncytial virus infections. *N.Engl.J.Med.* **293**:1343-1346.
60. **Hall, C. B., A. E. Kopelman, R. G. Douglas, Jr., J. M. Geiman, and M. P. Meagher.** 1979. Neonatal respiratory syncytial virus infection. *N.Engl.J Med.* **300**:393-396. doi:10.1056/NEJM197902223000803 [doi].
61. **Hallak, L., P. L. Collins, and W. Knudson.** 2000. Iduronic acid-containing glykosaminoglykans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. *Virology* **271**:264-275.

62. **Hansen, J. E., O. Lund, J. Engelbrecht, H. Bohr, J. O. Nielsen, and J. E. Hansen.** 1995. Prediction of O-glycosylation of mammalian proteins: specificity patterns of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *Biochem.J* **308** (Pt 3):801-813.
63. **Hardy, R. W., S. B. Harmon, and G. W. Wertz.** 1999. Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J Virol.* **73**:170-176.
64. **Hardy, R. W. and G. W. Wertz.** 1998. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol.* **72**:520-526.
65. **Henderson, F. W., A. M. Collier, W. A. Clyde, Jr., and F. W. Denny.** 1979. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N.Engl.J Med.* **300**:530-534. doi:10.1056/NEJM197903083001004 [doi].
66. **Hendricks, D. A., K. McIntosh, and J. L. Patterson.** 1988. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol.* **62**:2228-2233.
67. **Hendry, R. M., L. T. Pierik, and K. McIntosh.** 1989. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987. *J.Infect.Dis.* **160**:185-190.
68. **Hendry, R. M., A. L. Talis, E. Godfrey, L. J. Anderson, B. F. Fernie, and K. McIntosh.** 1986. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. *J.Infect.Dis.* **153**:291-297.
69. **Higgins, P. G., G. I. Barrow, D. A. Tyrrell, D. Isaacs, and C. L. Gauci.** 1990. The efficacy of intranasal interferon alpha-2a in respiratory syncytial virus infection in volunteers. *Antiviral Res.* **14**:3-10. doi:0166-3542(90)90061-B [pii].
70. **Hussell, T. and P. J. Openshaw.** 1998. Intracellular IFN-gamma expression in natural killer cells precedes lung CD8+ T cell recruitment during respiratory syncytial virus infection. *J.Gen.Virol.* **79** (Pt 11):2593-2601.
71. **Jin, H., X. Cheng, H. Z. Zhou, S. Li, and A. Seddiqui.** 2000. Respiratory syncytial virus that lacks open reading frame 2 of the M2 gene (M2-2) has altered growth characteristics and is attenuated in rodents. *J.Virol.* **74**:74-82.
72. **Johnson, P. R., M. K. Spriggs, R. A. Olmsted, and P. L. Collins.** 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **84**:5625-5629.
73. **Johnson, S., C. Oliver, G. A. Prince, V. G. Hemming, D. S. Pfarr, S. C. Wang, M. Dormitzer, J. O'Grady, S. Koenig, J. K. Tamura, R. Woods, G. Bansal, D. Couchenour, E. Tsao, W. C. Hall, and J. F. Young.** 1997. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J Infect.Dis.* **176**:1215-1224.

-
74. **Karron, R. A., Buonagurio DA, Georgiu AF, and et al.** 1997. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: Clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:13961-13966.
 75. **Kneyber, M. C., A. H. Brandenburg, P. H. Rothbarth, G. R. de, A. Ott, and H. A. van Steensel-Moll.** 1996. Relationship between clinical severity of respiratory syncytial virus infection and subtype. *Arch.Dis.Child* **75**:137-140.
 76. **Korber, B.** 2000. HIV Signature and Sequence Variation Analysis, p. 55-72. *In: A. G. Rodrigo and G. H. Learn (eds.), Computational Analysis of HIV Molecular Sequences.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
 77. **Kuo, L., R. Fearn, and P. L. Collins.** 1997. Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA. *J.Virol.* **71**:4944-4953.
 78. **Kuroiwa, Y., K. Nagai, L. Okita, I. Yui, T. Kase, T. Nakayama, and H. Tsutsumi.** 2005. A phylogenetic study of human respiratory syncytial viruses group A and B strains isolated in two cities in Japan from 1980-2002. *J.Med.Virol.* **76**:241-247.
 79. **Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg.** 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat.Immunol.* **1**:398-401. doi:10.1038/80833 [doi].
 80. **Langedijk, J. P., W. M. Schaaper, R. H. Melen, and J. T. van Oirschot.** 1996. Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. *J Gen.Virol.* **77 (Pt 6)**:1249-1257.
 81. **Levine, S., M. Peebles, and R. Hamilton.** 1977. Effect of respiratory syncytial virus infection of HeLa-cell macromolecular synthesis. *J.Gen.Virol.* **37**:53-63.
 82. **Löffler, G. and P. E. Petrides.** 2003. *Biochemie & Pathobiochemie.* Springer.
 83. **Lopez, J. A., R. Bustos, C. Orvell, M. Berois, J. Arbiza, B. Garcia-Barreno, and J. A. Melero.** 1998. Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J.Virol.* **72**:6922-6928.
 84. **Martinez, I., J. Dopazo, and J. A. Melero.** 1997. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J.Gen.Virol.* **78 (Pt 10)**:2419-2429.
 85. **Martinez, I. and J. A. Melero.** 1998. Enhanced neutralization of human respiratory syncytial virus by mixtures of monoclonal antibodies to the attachment (G) glycoprotein. *J.Gen.Virol.* **79 (Pt 9)**:2215-2220.
 86. **Martinez, I. and J. A. Melero.** 2002. A model for the generation of multiple A to G transitions in the human respiratory syncytial virus genome: predicted RNA secondary structures as substrates for adenosine deaminases that act on RNA. *J Gen.Virol.* **83**:1445-1455.

87. **Martinez, I., O. Valdes, A. Delfraro, J. Arbiza, J. Russi, and J. A. Melero.** 1999. Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B: the use of alternative termination codons and lineage diversification. *J.Gen.Virol.* **80 (Pt 1):**125-130.
88. **McNamara, P. S. and R. L. Smyth.** 2002. The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *Br.Med.Bull.* **61:**13-28.
89. **Meert, K. L., A. P. Sarnaik, M. J. Gelmini, and M. W. Lieh-Lai.** 1994. Aerosolized ribavirin in mechanically ventilated children with respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease: a prospective, double-blind, randomized trial. *Crit Care Med.* **22:**566-572.
90. **Milner, M. E., S. M. de la Monte, and G. M. Hutchins.** 1985. Fatal respiratory syncytial virus infection in severe combined immunodeficiency syndrome. *Am.J.Dis.Child* **139:**1111-1114.
91. **Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen.** 2001. *Molekulare Virologie.* Spektrum Akademischer Verlag.
92. **Moler, F. W., A. S. Khan, J. N. Meliones, J. R. Custer, J. Palmisano, and T. C. Shope.** 1992. Respiratory syncytial virus morbidity and mortality estimates in congenital heart disease patients: a recent experience. *Crit Care Med.* **20:**1406-1413.
93. **Morris, J., R. Blount, and R. Savage.** 1956. Recovery of cytopathic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* **92:**544-550.
94. **Mufson, M. A., R. B. Belshe, C. Orvell, and E. Norrby.** 1987. Subgroup characteristics of respiratory syncytial virus strains recovered from children with two consecutive infections. *J.Clin.Microbiol.* **25:**1535-1539.
95. **Mufson, M. A., C. Orvell, B. Rafnar, and E. Norrby.** 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J.Gen.Virol.* **66 (Pt 10):**2111-2124.
96. **Murphy, B. R., A. V. Sotnikov, L. A. Lawrence, S. M. Banks, and G. A. Prince.** 1990. Enhanced pulmonary histopathology is observed in cotton rats immunized with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) or purified F glycoprotein and challenged with RSV 3-6 months after immunization. *Vaccine* **8:**497-502. doi:0264-410X(90)90253-I [pii].
97. **Nagai, K., H. Kamasaki, Y. Kuroiwa, L. Okita, and H. Tsutsumi.** 2004. Nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus subgroup B variants with the 60 nucleotides-duplicated G proteine gene. *J Med.Virol.* **74:**161-165.
98. **Navas, L., E. Wang, C. de, V, and J. Robinson.** 1992. Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of Canadian children. *Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada.* *J.Pediatr.* **121:**348-354.
99. **Nei, M. and T. Gojobori.** 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol.Biol.Evol.* **3:**418-426.

100. **Neves, B. J., C. Fonseca, M. Cardoso, A. Azevedo, and V. A. Bonito.** 2001. [Relationship between respiratory syncytial virus subtype and clinical severity in bronchiolitis]. *An.Esp.Pediatr.* **54**:559-566.
101. **Palomo, C., B. Garcia-Barreno, C. Penas, and J. A. Melero.** 1991. The G protein of human respiratory syncytial virus: significance of carbohydrate side-chains and the C-terminal end to its antigenicity. *J.Gen.Virol.* **72 (Pt 3)**:669-675.
102. **Panuska, J. R., R. Merolla, N. A. Rebert, S. P. Hoffmann, P. Tsivitse, N. M. Cirino, R. H. Silverman, and J. A. Rankin.** 1995. Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. Suppression of early cytokine production and implications for incomplete immunity. *J.Clin.Invest* **96**:2445-2453. doi:10.1172/JCI118302 [doi].
103. **Papadopoulos, N. G., D. Gourgiotis, A. Javadyan, A. Bossios, K. Kallergi, S. Psarras, M. N. Tsofia, and D. Kafetzis.** 2004. Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? *Respir.Med.* **98**:879-882.
104. **Parveen, S., W. M. Sullender, K. Fowler, E. J. Lefkowitz, S. K. Kapoor, and S. Broor.** 2006. Genetic variability in the G protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. *J.Clin.Microbiol.* **44**:3055-3064.
105. **Pastey, M. K., T. L. Gower, P. W. Spearman, J. E. Crowe, Jr., and B. S. Graham.** 2000. A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. *Nat.Med* **6**:35-40.
106. **Pastey, M., J. E. Crowe, and B. S. Graham.** 1999. RhoA interacts with the fusion glykoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J Virol.* **73**:7262-7270.
107. **Peret, T. C., C. B. Hall, K. C. Schnabel, J. A. Golub, and L. J. Anderson.** 1998. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen.Virol.* **79 (Pt 9)**:2221-2229.
108. **Perez, M., B. Garcia-Barreno, J. A. Melero, and et al.** 1997. Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus. *Virology* **235**:342-351.
109. **Pollack, P. and J. R. Grootuis.** 2002. Development and use of palivizumab (Synagis): a passive immunoprophylactic agent for RSV. *J Infect.Chemother.* **8**:201-206.
110. **Pringle, C. R., A. H. Filipiuk, B. S. Robinson, P. J. Watt, P. Higgins, and D. A. Tyrrell.** 1993. Immunogenicity and pathogenicity of a triple temperature-sensitive modified respiratory syncytial virus in adult volunteers. *Vaccine* **11**:473-478. doi:0264-410X(93)90290-E [pii].
111. **Randolph, A. G. and E. E. Wang.** 1996. Ribavirin for respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. A systematic overview. *Arch.Pediatr.Adolesc.Med.* **150**:942-947.

112. **Randolph, A. G. and E. E. Wang.** 2000. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract. *Cochrane.Database.Syst.Rev.*CD000181. doi:CD000181 [pii];10.1002/14651858.CD000181 [doi].
113. **Reiche, J. and B. Schweiger.** 2009. Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007. *J.Clin.Microbiol.* **47**:1800-1810. doi:JCM.02286-08 [pii];10.1128/JCM.02286-08 [doi].
114. **Roberts, S. R., R. W. Compans, and G. W. Wertz.** 1995. Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J.Virol.* **69**:2667-2673.
115. **Roberts, S. R., D. Lichtenstein, L. A. Ball, and G. W. Wertz.** 1994. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J.Virol.* **68**:4538-4546.
116. **Roca, A., M. P. Loscertales, L. Quinto, P. Perez-Brena, N. Vaz, P. L. Alonso, and J. C. Saiz.** 2001. Genetic variability among group A and B respiratory syncytial viruses in Mozambique: identification of a new cluster of group B isolates. *J.Gen.Virol.* **82**:103-111.
117. **Rodriguez, W. J.** 1999. Management strategies for respiratory syncytial virus infections in infants. *J.Pediatr.* **135**:45-50. doi:a99806 [pii].
118. **Roosevelt, G., K. Sheehan, J. Grupp-Phelan, R. R. Tanz, and R. Listernick.** 1996. Dexamethasone in bronchiolitis: a randomised controlled trial. *Lancet* **348**:292-295. doi:S0140673696022854 [pii].
119. **Saitou, N. and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.* **4**:406-425.
120. **Sanchez-Seco, M. P., J. Navarro, R. Martinez, and N. Villanueva.** 1995. C-terminal phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein occurs mainly at serine residue 232. *J Gen.Virol.* **76 (Pt 2)**:425-430.
121. **Satake, M., J. E. Coligan, N. Elango, E. Norrby, and S. Venkatesan.** 1985. Respiratory syncytial virus envelope glycoprotein (G) has a novel structure. *Nucleic Acids Res.* **13**:7795-7812.
122. **Sato, M., R. Saito, T. Sakai, Y. Sano, M. Nishikawa, A. Sasaki, Y. Shobugawa, F. Gejyo, and H. Suzuki.** 2005. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J.Clin.Microbiol.* **43**:36-40.
123. **Scott, P. D., R. Ochola, M. Ngama, E. A. Okiro, D. J. Nokes, G. F. Medley, and P. A. Cane.** 2004. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. *J Med.Virol.* **74**:344-354.
124. **Shay, D., R. Holman, R. Newman, Liu LL, J. Stout, and L. J. Anderson.** 1996. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* **282**:1440-1446.

125. **Smyth, R. L., K. J. Mobbs, U. O'Hea, D. Ashby, and C. A. Hart.** 2002. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: disease severity, interleukin-8, and virus genotype. *Pediatr.Pulmonol.* **33**:339-346. doi:10.1002/ppul.10080 [pii].
126. **Spann, K. M., K. C. Tran, B. Chi, R. L. Rabin, and P. L. Collins.** 2004. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J.Virol.* **78**:4363-4369.
127. **Spann, K. M., K. C. Tran, and P. L. Collins.** 2005. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J.Virol.* **79**:5353-5362. doi:79/9/5353 [pii];10.1128/JVI.79.9.5353-5362.2005 [doi].
128. **Srikiatkachorn, A. and T. J. Braciale.** 1997. Virus-specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J.Exp.Med.* **186**:421-432.
129. **Stec, D. S., M. G. Hill, III, and P. L. Collins.** 1991. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology* **183**:273-287.
130. **Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol.Biol.Evol.* **24**:1596-1599. doi:msm092 [pii];10.1093/molbev/msm092 [doi].
131. **Tamura, K., M. Nei, and S. Kumar.** 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**:11030-11035. doi:10.1073/pnas.0404206101 [doi];0404206101 [pii].
132. **Teng, M. N. and P. L. Collins.** 1998. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J.Virol.* **72**:5707-5716.
133. **Teng, M. N. and P. L. Collins.** 1999. Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. *J Virol.* **73**:466-473.
134. **Teng, M. N., S. S. Whitehead, A. Bermingham, M. St Claire, W. R. Elkins, B. R. Murphy, and P. L. Collins.** 2000. Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J Virol.* **74**:9317-9321.
135. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
136. **Trento, A., M. Galiano, C. Videla, G. Carballal, B. Garcia-Barreno, J. A. Melero, and C. Palomo.** 2003. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J.Gen.Virol.* **84**:3115-3120.

137. **Trento, A., M. Viegas, M. Galiano, C. Videla, G. Carballal, A. S. Mistchenko, and J. A. Melero.** 2006. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. *J.Virol.* **80**:975-984.
138. **Tsutsumi, H., M. Onuma, K. Suga, T. Honjo, Y. Chiba, S. Chiba, and P. L. Ogra.** 1988. Occurrence of respiratory syncytial virus subgroup A and B strains in Japan, 1980 to 1987. *J.Clin.Microbiol.* **26**:1171-1174.
139. **Venter, M., S. A. Madhi, C. T. Tiemessen, and B. D. Schoub.** 2001. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J.Gen.Virol.* **82**:2117-2124.
140. **Walsh, E. E. and A. R. Falsey.** 2004. Humoral and mucosal immunity in protection from natural respiratory syncytial virus infection in adults. *J Infect.Dis.* **190**:373-378.
141. **Walsh, E. E., K. M. McConnochie, C. E. Long, and C. B. Hall.** 1997. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J.Infect.Dis.* **175**:814-820.
142. **Weitkamp, J.-H. and J. E. Crowe, Jr.** 2000. Aktuelle Ansätze zur Impfstoffentwicklung gegen Respiratory-Syncytial-Virus (RSV). *Monatsschrift Kinderheilkunde* **148**:980-989.
143. **Wertz, G. W., P. L. Collins, Y. Huang, C. Gruber, S. Levine, and L. A. Ball.** 1985. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**:4075-4079.
144. **Wertz, G. W., M. Krieger, and L. A. Ball.** 1989. Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosylation. *J.Virol.* **63**:4767-4776.
145. **Whitehead, S. S., A. Bukreyev, M. N. Teng, C. Y. Firestone, M. St Claire, W. R. Elkins, P. L. Collins, and B. R. Murphy.** 1999. Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. *J Virol.* **73**:3438-3442.
146. **Wright, P. F., T. Shinozaki, W. Fleet, S. H. Sell, J. Thompson, and D. T. Karzon.** 1976. Evaluation of a live, attenuated respiratory syncytial virus vaccine in infants. *J.Pediatr.* **88**:931-936.
147. **Wu, S. J., A. Schmidt, E. J. Beil, N. D. Day, P. J. Branigan, C. Liu, L. L. Gutshall, C. Palomo, J. Furze, G. Taylor, J. A. Melero, P. Tsui, A. M. Del Vecchio, and M. Kruszynski.** 2007. Characterization of the epitope for anti-human respiratory syncytial virus F protein monoclonal antibody 101F using synthetic peptides and genetic approaches. *J Gen.Virol.* **88**:2719-2723.
148. **Yamashita, M., M. Krystal, W. M. Fitch, and P. Palese.** 1988. Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology* **163**:112-122.

-
149. **Zheng, H., G. A. Storch, C. Zang, T. C. Peret, C. S. Park, and L. J. Anderson.** 1999. Genetic variability in envelope-associated protein genes of closely related group A strains of respiratory syncytial virus. *Virus Res.* **59**:89-99.
 150. **Zlateva, K. T., P. Lemey, E. Moes, A. M. Vandamme, and M. Van Ranst.** 2005. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J.Virol.* **79**:9157-9167.
 151. **Zlateva, K. T., P. Lemey, A. M. Vandamme, and M. Van Ranst.** 2004. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup a: positively selected sites in the attachment g glycoprotein. *J.Virol.* **78**:4675-4683.
 152. **Zlateva, K. T., L. Vijgen, N. Dekeersmaecker, C. Naranjo, and R. M. Van.** 2007. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *J Clin.Microbiol.* **45**:3022-3030. doi:JCM.00339-07 [pii];10.1128/JCM.00339-07 [doi].

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Judith Werzmirzowsky

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Ortwin Adams für die Überlassung der Fragestellung, die jahrelange gute Betreuung, die Hilfsbereitschaft, die fachliche Unterstützung, die vielen Stunden, die er auch am Wochenende und abends erreichbar war oder mit Korrekturlesen verbracht hat und nicht zuletzt für sein Durchhaltevermögen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den MTAs des Instituts, die mir stets mit Rat und Tat beiseite standen und für die Einarbeitung in die Techniken der Virusanzucht sowie der Molekularbiologie unersetzlich waren.

Mein Dank gilt desweiteren der gesamten Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Nicht zuletzt möchte ich mich herzlich bei meiner Familie bedanken für die vielen Aufmunterungen, die Unterstützung und das Appellieren an mein Durchhaltevermögen – danke!