

Aus dem
Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Univ.-Prof. Dr. Jörg Timm

**VERLAUF DER HUMORALEN IMMUNITÄT GEGEN DAS
RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN ADULTEN**

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Andreas Puck

2016

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

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. Adams

Zweitgutachter: Prof. Dr. Schuster

1	EINLEITUNG	7
1.1	VIREN ALS ERREGER VON ATEMWEGSINFEKTEN	7
1.2	EPIDEMIOLOGIE DES RS – VIRUS	7
1.3	BESONDERHEITEN DES GENOMS VON RS - VIREN	8
1.4	ALLGEMEINE FUNKTION VON VIRUSPROTEINEN	8
1.5	STRUKTURPROTEINE	9
1.6	DAS NUCLEOCAPSID	9
1.6.1	L – PROTEIN	10
1.6.2	P – PROTEIN	10
1.6.3	N – PROTEIN	10
1.6.4	M 2 - 1 PROTEIN	11
1.7	M – PROTEIN	11
1.8	G – PROTEIN	12
1.9	F – PROTEIN (FUSIONSPROTEIN)	12
1.10	NICHTSTRUKTURPROTEINE	13
1.11	INFEKTION DER ZIELZELLE DURCH DAS RS - VIRUS	13
1.12	KRANKHEITSVERLAUF IN KINDES UND ERWACHSENENALTER	14
1.13	ALLGEMEINE REAKTION DES IMMUNSYSTEMS	16
1.13.1	UNSPECIFISCHE IMMUNANTWORT	16
1.13.2	SPEZIFISCHE IMMUNANTWORT	17
1.13.2.1	T – ZELL ANTWORT	17
1.13.2.2	B-ZELL ANTWORT UND BILDUNG SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER	18
1.14	REAKTION DES IMMUNSYSTEMS AUF RS – VIRUS INFEKTION	19
1.15	FRAGESTELLUNG	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	LISTE DER VERWENDETEN MATERIALIEN	21
2.1.1	MATERIALIEN, ARBEITSPLATZÜBERGREIFEND	21
2.1.2	ZELLKULTUR UND VIRUSISOLIERUNG	21
2.1.3	ZELLKULTURGEFÄßE/-GERÄTE	21
2.1.4	ZELLKULTURMEDIEN	22
2.1.5	ANTI-KÖRPER	22
2.1.6	CHEMIKALIEN/MEDIEN	22
2.1.7	KITS	22
2.1.8	GERÄTE	22
2.2	METHODIK	23
2.2.1	ZUSAMMENSTELLUNG DES STUDIENKOLLEKTIVS	23
2.2.2	ZELLZÄHLUNG IN DER NEUBAUER-ZÄHLKAMMER	23
2.2.3	EINFRIEREN VON ZELLEN	23
2.2.4	AUFTAUEN VON ZELLEN	24

2.2.5	VIRUSINFEKTION VON ZELLINIEN	24
2.2.6	VIRUSINFEKTION	25
2.2.7	CYTOPATHISCHER EFFEKT UND VIRUSERNTE	25
2.2.8	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	25
2.2.9	HERSTELLUNG UND VORBEREITUNG VON RSV – ELISA – PLATTEN	27
2.2.10	NACHWEIS DER ANTIKÖRPER	28
2.2.11	DURCHFÜHRUNG DES ANTIKÖRPERNACHWEISES IM ELISA	30
2.2.12	VORBEREITUNG VON 96-WELL-ZELLKULTURPLATTEN ZUR QUANTIFIZIERUNG DES VIRUSGEHALTES MITTELS TCID ₅₀	31
2.2.13	DURCHFÜHRUNG DES TCID ₅₀	32
2.2.14	RSV – ANTIGENNACHWEIS IN INFIZIERTEN HEP – 2 ZELLEN MITTELS RSV – NEUTRALISATIONSTEST	33
2.2.15	RSV – ANTIGENNACHWEIS IN INFIZIERTEN HEP – 2 ZELLEN MITTELS ELISA	35
2.2.16	NACHWEIS VON RSV–F UND RSV – N ANTIKÖRPERN IN PATIENTENSEREN MITTELS ELISA	36
3	ERGEBNISSE	38
3.1	ERGEBNISSE DES GESAMT - ELISA	38
3.1.1	ERGEBNIS DER RSV – A STÄMME	39
3.1.2	ERGEBNIS DER RSV – B STÄMME IM GESAMT - ELISA	41
3.2	GESAMTERGEBNISSE DES NEUTRALISATIONSTESTES	43
3.2.1	ERGEBNIS NEUTRALISATIONSTEST RSV – A STÄMME	44
3.2.2	ERGEBNIS N- TEST RSV – B STÄMME	46
3.3	ERGEBNIS N – UND F - ELISA	49
4	DISKUSSION	51
4.1	DISKUSSION ERGEBNISSE DER RSV A STÄMME	51
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE DER RSV B STÄMME	52
4.3	ERKLÄRUNGSANSÄTZE FÜR DAS UNTERSCHIEDLICHE VERHALTEN DER RSV-A UND RSV-B-STÄMME	53
4.4	DISKUSSIONEN DER ERGEBNISSE DES N- UND F – ELISA	56
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
6	DANKSAGUNG	64

Liste der verwendeten Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Rinderserum-Albumin
CD14	Glykoprotein CD14 (cluster of differentiation)
CD4 ⁺ /8 ⁺	Glykoprotein CD4-/CD8-positive Zellen
CPE	cytopathischer Effekt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure x Na ₂ -Salz
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
FCS	Fötale Kälberserum
F-Protein	Fusionsprotein
G-Protein	Glykoprotein
H-Protein	Hämagglutinin-Protein
HEp2	humane Larynx-Carcinom-Zelllinie
HN-Protein	Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein
HRPO	Horse-radish-peroxidase
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IgA/IgE/IgG/IgM	Immunglobulin A/E/G/M
kd	Kilodalton
Kb	kilobasen
L	Leucin
L-Protein	Large Protein
MAb	Monoklonaler Antikörper
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MHC	Major histocompatibility complex
M-Protein	Matrix Protein
mRNA	Messenger RNA
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
N-/NP-Protein	Nucleocapsid-Protein
NS-Protein	Nichtstruktur-Protein
PBS	phosphat buffered saline
PH	-log [H ⁺]
POD	Peroxidase
Puffer EB	Elution Buffer
Puffer PBI	Binding Buffer

Puffer PE	Waschpuffer
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
SH-Protein	Small hydrophobic Protein
Sog.	Sogenannt
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat mit EDTA
TCID50	Tissue Culture Infectious Dosis 50
TH1/TH2	T-Helferzellen 1/2
TLR4	Toll like Rezeptor 4
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Viren als Erreger von Atemwegsinfekten

Viren sind in der Lage, abhängig von der Stärke des Immunsystems des Wirtes zum Teil schwerwiegende Erkrankungen hervorzurufen. Eine Untergruppe der Gesamtheit der Viren sind die so genannten „Respirationstraktviren“. Sie befallen vorzugsweise, wie ihr Name schon andeutet, die Atemwege, wo ihre Replikation stattfindet. Im Folgenden wird ein Hauptaugenmerk auf das Respiratory syncytial Virus (kurz RS – Virus) gelegt und dessen Aufbau, Pathogenese und die damit verbundene Klinik der Patienten näher erläutert (Allander, T., Jartti, T., Gupta, S., Niesters, H. G., Lehtinen, P., Osterback, R. et al. 2007).

1.2 Epidemiologie des RS – Virus

Das Respiratory syncytial Virus ist ein vorwiegend im frühen Säuglingsalter und Kindesalter vorkommender Erreger zum Teil schwer verlaufender Erkrankungen der unteren Atemwege (Openshaw, P. J. 2005). Seit 1980 konnte ebenfalls eine vermehrte Auftreten auch beim älteren Erwachsenen, zum Teil mit letalem Ausgang, festgestellt werden. In verschiedenen Publikationen wird beschrieben, dass das RS – Virus die zweite Position hinter dem Influenza Virus als Erreger schwerer Erkrankungen in dieser Zielgruppe einnimmt (Falsey, A. R. & Walsh, E. E. 2005; Openshaw, P. J. 2005). Das RS – Virus gehört zur Familie der Paramyxoviridae, in der es in die Untergruppe der Pneumoviridae einzuordnen ist. Es ist daher wie alle Viren dieser Familie von einer Doppel – Lipidschicht umgeben, die als Hülle dient, und ist somit als behülltes Virus zu bezeichnen (Tripp, R. A. 2004). Das RS - Virus wurde zuerst im Jahre 1956 von J. Morris et al. in Schimpansen beschrieben, die eine Schnupfensymptomatik aufwiesen (Blount, R. E., Jr., MORRIS, J. A., & SAVAGE, R. E. 1956; Chanock, R. M., Kim, H. W., Vargosko, A. J., DELEVA, A., JOHNSON, K. M., CUMMING, C. et al. 1961). Ein Jahr später konnte durch R.M. Chanhock et al. in Kindern mit schweren Erkrankungen der unteren Atemwege ein Virus isoliert werden, das identisch mit diesem Virus war, das zuvor in den Schimpansen isoliert worden war (Chanock, R. M. et al. 1961). Auf Grund seiner Eigenschaft, in vitro eine Bildung von Syncytien zu induzieren, erhielt es seinen heutigen Namen Respiratory syncytial Virus. Das Virus kann in 3 Subtypen

unterteilt werden, in RSV – A, RSV – B Stämme und Bovine – RSV (Peret, T. C., Hall, C. B., Schnabel, K. C., Golub, J. A., & Anderson, L. J. 1998). Die jeweiligen Stämme unterscheiden sich vorwiegend über die Sequenz der G – Proteine (Duncan, R. B., Jr. & Potgieter, L. N. 1993).

1.3 Besonderheiten des Genoms von RS - Viren

Die Paramyxoviren und somit auch das RS – Virus, sind Viren, die ein einzelsträngiges RNA – Genom mit einer Größe von 16 – 20Kb aufweisen. Ein besonderes Augenmerk ist hierbei auf die negative Polarität des RNA-Einzelstranges zu legen (Grosfeld, H., Hill, M. G., & Collins, P. L. 1995). Eine negative Polarität des RNA – Einzelstranges bedeutet, dass die RNA eine anti – mRNA- Polarität aufweist. Das RS - Virus benötigt eine eigene RNA-abhängige RNA – Polymerase, um enzymatisch anhand der negativen mRNA einen komplementäre positiven mRNA-Strang zu synthetisieren. Dieses Verfahren des Virus wird benötigt, um eine Translation der mRNA in die Aminosäuresequenzen und schließlich in die Virusproteine zu ermöglichen (Liuzzi, M., Mason, S. W., Cartier, M., Lawetz, C., McCollum, R. S., Dansereau, N. et al. 2005).

1.4 Allgemeine Funktion von Virusproteinen

Proteine erfüllen verschiedene Aufgaben während Infektion und Reproduktion innerhalb der infizierten Wirtszelle. Des Weiteren dienen Proteine der Strukturvorgabe und Capsidbildung. Im Folgenden werden die Proteine vorgestellt, die das RS – Virus zur Fusion, Reproduktion und abschließenden Ausschleusung benötigt.

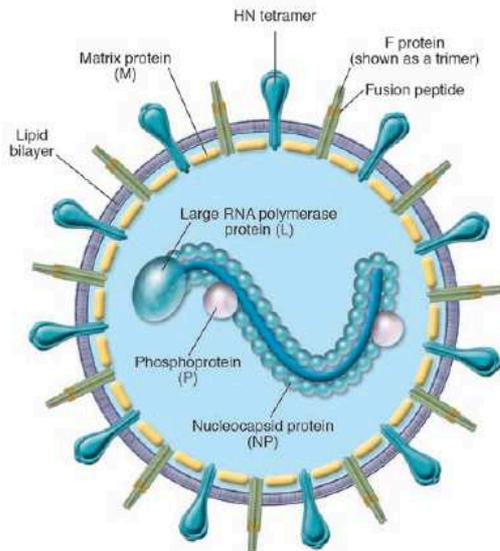


Abb. 1: Aufbau der Paramyxoviren, Quelle:(Moscona, A. 2005) HN= Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein, F= Fusionsprotein

1.5 Strukturproteine

Die äußere Erscheinung des Virions wird vorwiegend durch Eiweißstrukturen, die sogenannten Strukturproteine, vorgegeben. In weiterer Funktion sind diese ebenfalls mit dem Genom des Virus assoziiert und bilden als Glykoproteine Strukturen der äußeren Hülle des Virus.

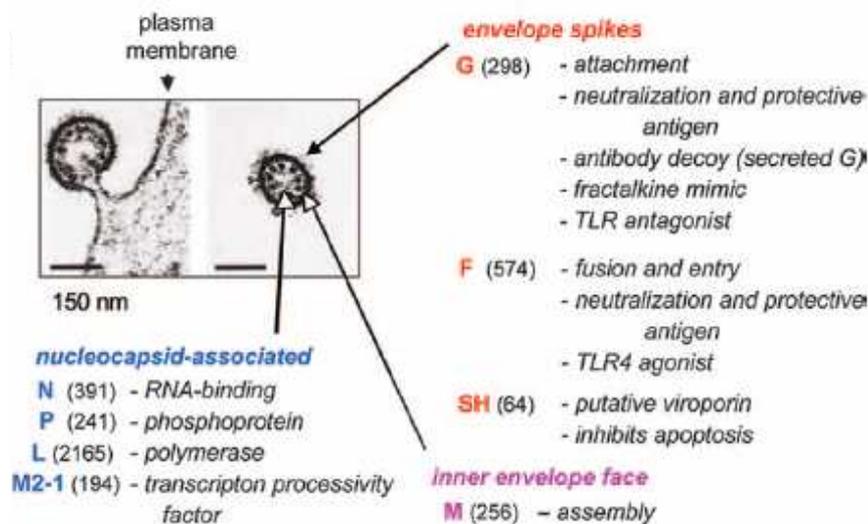


Abb. 2 : Proteine des RS – Virus und ihre Funktion Quelle: (Collins, P. L. & Graham, B. S. 2008)

1.6 Das Nucleocapsid

Das Nucleocapsid ist eine innere Hülle, die die negative Einzelstrang-RNA des Virus schützt. Als Bestandteile des Capsids dienen verschiedene auf der RNA des Virus kodierte Proteine, die mit der Einzelstrang RNA interagieren und mit dieser in einem

Nucleoproteinkomplex aggregiert vorliegen. Die Proteine dieses Komplexes erfüllen im Replikationszyklus des Virus spezifische Aufgaben (El, O. K., Dhaliwal, B., Ren, J., Abrescia, N. G., Lockyer, M., Powell, K. L. et al. 2011). Im Folgenden werden die für das RS – Virus spezifischen Proteine benannt und ihre Aufgabe erläutert.

1.6.1 L – Protein

In Abschnitt 1.3 wurde beschrieben, dass das RS – Virus eine RNA – abhängige RNA – Polymerase benutzt um den Negativ-Strang der RNA in einen positiven Strang umzuschreiben. Diese Funktion wird durch das large – Protein (L- Proteine) durchgeführt (Dochow, M., Krumm, S. A., Crowe, J. E., Jr., Moore, M. L., & Plemper, R. K. 2012), das ein Molekulargewicht von 250 kD aufweist. Das L – Protein bildet in diesem Zusammenhang mit dem P – und N – Protein, die im Anschluss beschrieben werden einen Komplex, in dem das L – Protein als Hauptuntereinheit der RNA – abhängigen RNA Polymerase fungiert(Grosfeld, H., Hill, M. G., & Collins, P. L. 1995).

1.6.2 P- Protein

Das phosphorylierte - Protein (P- Protein) spielt im Rahmen des Replikationsprozesses des RS – Virus eine entscheidende Rolle. Es interagiert sowohl mit dem N –, L – und M Protein. Hierbei bildet das P- Protein mit dem N – Protein eine Struktur, die die abschließende Bindung der RNA mit dem N – Protein gewährleistet, die so genannte Capsidierung (Asenjo, A., Mendieta, J., Gomez-Puertas, P., & Villanueva, N. 2008). Der Zusammenhang von P Protein und large Protein ist die Assoziation dieser Strukturen innerhalb der Bildung der RNA – abhängigen RNA – Polymerase, in der das P – Protein als essentieller Co – Faktor der Replikation dient (Llorente, M. T., Garcia-Barreno, B., Calero, M., Camafeita, E., Lopez, J. A., Longhi, S. et al. 2006).

1.6.3 N – Protein

Das Nucleocapsidprotein, im weiteren Verlauf abgekürzt als N – Protein, ist ein 391kb großes Protein, das seine Funktion im Schutz der RNA vor abbauenden Prozessen und im weiteren Sinne die Flexibilität der viralen RNA ermöglicht. Diese Aufgabe erfüllt es durch Interaktion mit dieser RNA an spezifischen Basenpaaren. Innerhalb einer Helixwindung kommt es zu einer Bindung von 11 - 13 N – Proteinmolekülen und viraler RNA. Das N – Protein ist als Hauptbestandteil des

Nucleosidkomplexes ebenfalls an der Interaktion von L –und P – Proteinen beteiligt, um hiermit eine einwandfreie Replikation und Transkription der viralen RNA zu gewährleisten (Yu, Q., Hardy, R. W., & Wertz, G. W. 1995). Es ist anzunehmen, dass dem N – Protein eine Schalterfunktion zuzuschreiben ist, die ein Umschalten von Transkription auf RNA – Replikation ermöglicht. Dieser Annahme zugrunde liegend ist das 1974 von Kingsbury postulierte Modell. Hier wurde beschrieben, dass sowohl Replikation als auch Transkription an derselben RNA – Polymerase ihren Ursprung haben, die durchzuführende Aktion aber abhängig sei von der Anzahl der vorhandenen N – Proteine. Das N – Protein lagert sich hierbei dem Negativ – RNA – Strang an und verhindert durch diese Interaktion einen Abbruch der RNA – Synthese (Kingsbury, D. W. 1974). Es erfolgt eine vollständige Replikation des viralen RNA - Stranges, der als Grundlage für die Produktion neuer Virusgenome dient.

1.6.4 M 2 - 1 Protein

Das M2 – 1 Protein ist ein weiterer wichtiger Bestandteil des von Large – Protein und P – Protein gebildeten Polymerasekomplexes. Es dient der Regulation der Umschaltung zwischen Transkription und Replikation (Garcia, J., Garcia-Barreno, B., Vivo, A., & Melero, J. A. 1993) und der Produktion einer RNA in voller Länge. Im Verlauf dieser Prozesse verhindert das M2-1 Protein deren Abbruch und ermöglicht somit eine Bildung einer mRNA in voller Länge (Blondot, M. L., Dubosclard, V., Fix, J., Lassoued, S., Aumont-Nicaise, M., Bontems, F. et al. 2012). Das Protein ist M2 – 1 ist phosphoryliert und weist in seinem Aufbau Regionen auf, die eine Affinität für Zink – Ionen aufweisen (Tran, T. L., Castagne, N., Dubosclard, V., Noinville, S., Koch, E., Moudjou, M. et al. 2009).

1.7 M – Protein

Das Matrix – Protein ist ein nicht – glycolysiertes Protein mit einer Größe von 22 kDa. Es fungiert im Rahmen der Virusreplikation als Schnittstelle zwischen den Proteinen des Nucleocapsids und den auf der Außenmembran lokalisierten F – und G – Proteinen (Harrison, M. S., Sakaguchi, T., & Schmitt, A. P. 2010). Die Funktion des Matrix – Proteins liegt in diesem Sinne bei der Koordination der Zusammenführung dieser Proteine (Kondo, T., Yoshida, T., Miura, N., & Nakanishi, M. 1993). Das Matrix – Protein ist auf der Innenseite der Hüllmembran lokalisiert,

die es auch auskleidet. Eine Verbindung mit der Außenmembran des Virus besteht hierbei nicht. Die Interaktion zwischen Nucleocapsid und Matrix – Protein findet über das im vorherigen Abschnitt beschriebene M2 – 1 Protein statt. Die Funktion des Matrix – Proteins ist die Verpackung des Virus nach vorheriger Bildung der Hüllproteine und somit die abschließende Zusammenführung dieser Virusbestandteile.

1.8 G – Protein

Das glycosylierte Protein ist ein spezifisches Protein des RS – Virus, das eine Größe von 90 kDa aufweist (Levine, S., Klaiber-Franco, R., & Paradiso, P. R. 1987); (Wagner, D. K., Nelson, D. L., Walsh, E. E., Reimer, C. B., Henderson, F. W., & Murphy, B. R. 1987). Dem G – Protein kommt die Funktion der spezifischen Adhäsion an der Zielzelle, die im Falle des RS – Virus den bronchialen Epithelzellen der unteren Atemwege entspricht, zu, wobei es die Adhäsion an die Zielzelle nur verstärkt und keine Bedingung für die Zelladhäsion darstellt (Techaarpornkul, S., Collins, P. L., & Peeples, M. E. 2002). Das G – Protein ermöglicht dem RS – Virus ebenfalls durch Mutation sich der Abwehrreaktion des Körpers zu entziehen und somit die immunologische Abwehr zu unterlaufen (Oshansky, C. M., Zhang, W., Moore, E., & Tripp, R. A. 2009). Seine Funktion ist vergleichbar mit dem der HN – Proteine der Vertreter der Familie der Paramyxoviridae. Allerdings fehlt dem G – Protein der RS – Viren die Funktion der Hämagglutination und Neuramidase, die die Funktion der HN – Proteine prägt.

1.9 F – Protein (Fusionsprotein)

Das Fusionsprotein ist ein Komplex bestehend aus zwei in der Virushüllmembran verankerten Proteinen. Dieser Komplex dient dem Virus zur Einleitung der Fusion mit der Wirtszelle und ist somit unabdingbar für die Adsorption, Membranfusion und Infektion der Zielzelle (Techaarpornkul, S. et al. 2002). Hierzu liegt das Fusionsprotein in einem Heterodimer vor, das aus dem glycosylierten F2 – Protein, dessen Größe 20kDa beträgt und dem glycosylierten und gleichzeitig acylierten F1 - Protein besteht, das eine Größe von 48kDa aufweist (Ferne, B. F., Dapolito, G., Cote, P. J., Jr., & Gerin, J. L. 1985; Samson, A. C., Willcocks, M. M., Routledge, E. G., Morgan, L. A., & Toms, G. L. 1986). Diese Proteine, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, bilden den fusionsaktiven Komplex, der

fest in der Hüllmembran des RS – Virus verankert ist (Ferne, B. F. et al. 1985). Primär wird dieser Komplex als inaktives F0 – Protein in die Zielzelle eingeschleust (Collins, P. L. & Mottet, G. 1991). Das Vorläuferprotein wird über ein Signalpeptid in die Zelle eingeschleust, durch eine spezifische Protease des Golgiapparates der infizierten Zelle gespalten und in der infizierten Zelle prozessiert. Die Protease des Golgiapparates bewirkt hierbei die Spaltung des F0 – Proteins in die aktiven Formen, dem F1 – Protein und F2 – Protein (Ferne, B. F. et al. 1985).

1.10 Nichtstrukturproteine

Nichtstrukturproteine sind Proteine, die im Verlauf der Virusreplikation gebildet werden, aber keine Funktion im abschließend gebildeten Virion haben und in diesem auch nicht vorhanden sind. Das RS – Virus verfügt über 2 Nichtstrukturproteine, NS-1 und NS-2. Diese Proteine ermöglichen es dem RS – Virus, sich der interferonvermittelten Immunabwehr zu entziehen (Spann, K. M., Tran, K. C., & Collins, P. L. 2005) (Schlender, J., Bossert, B., Buchholz, U., & Conzelmann, K. K. 2000). Die Proteine NS-1 und NS-2 induzieren einen Abbau der STAT-2 Kinase über die in der Zelle vorhandenen Proteasomen und verhindern somit die Transkription der Gene für Interferon α und β (Lo, M. S., Brazas, R. M., & Holtzman, M. J. 2005).

1.11 Infektion der Zielzelle durch das RS - Virus

Die Anheftung des RS – Virus an der Zielzelle der unteren Atemwege setzt das Vorhandensein und die Aktivität des G – Proteins und F- Proteins voraus. Das G – Protein bindet an eine endständige Neuraminsäure der Zielzellmembran. Bei diesem Vorgang wird der primäre Kontakt mit der Cytoplasmamembran der zu infizierenden Zielzelle hergestellt (Levine, S., Klaiber-Franco, R., & Paradiso, P. R. 1987). Es ist dabei aber nicht als eigenständiger Rezeptor anzusehen, sondern als fester Bestandteil der Hüllmembran. Nachdem der Primärkontakt durch das G – Protein hergestellt wurde, wodurch Virushülle und Zellmembran in „enge räumliche Nähe“ zueinander getreten sind, kommt es nun in einem weiteren Schritt zur eigentlichen Zellfusion. Das F1 – Protein, das über eine Disulfidbrücke mit seinem interagierenden Partner, dem F2 – Protein, welches in der Virusmembran verankert ist, verbunden ist, kann auf Grund seines hydrophoben Charakters die Lipiddoppelschicht der Wirtszelle durchdringen. Durch diesen Vorgang wird der Abstand zwischen den Zellmembranen weiter verringert. Die Zellfusion wird durch

die Eigenschaften der Lipiddoppelschichten zum einen des Virus und zum anderen der Zielzelle ermöglicht. Es kommt zu einem Ineinandergleiten der Zellmembranen, wobei nachfolgend das im Virion enthaltene Nucleocapsid in die Zielzelle entlassen wird (Scheid, A., Hsu, M., & Choppin, P. W. 1980). Eine Inhibierung des F – Proteins kann durch monoklonale Antikörper unter anderem Palivizumab und Motavizumab erfolgen, die die Adsorption des Virus an der Zielzelle verhindern und somit eine Infektion inhibieren (Feldes, T. F. & Sondheimer, H. M. 2007). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass neutralisierende Antikörper, die das F – Protein abblocken, die Aufnahme des RS – Virus verhindern und somit keine Infektion der Zielzelle erfolgt.

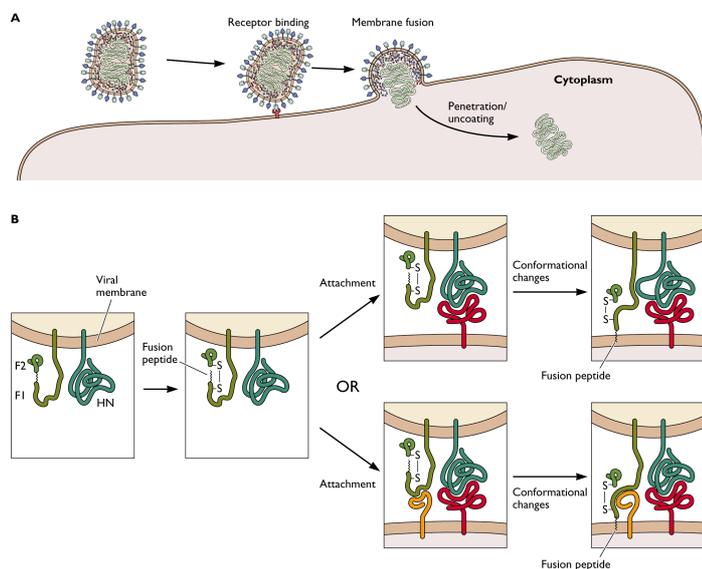


Abb. 3 : Viruseintritt von Paramyxoviren in die Zielzelle: die Verschmelzung von Virus- und Zellmembran findet an der äußeren Zellmembran statt. Das RS - Virus besitzt statt des in der Abb. gezeigten HN - Proteins das G Protein Quelle : Flint et al :Principles of Virology, 2nd Edition 2005

1.12 Krankheitsverlauf in Kindes und Erwachsenenalter

Das RS – Virus kann bei Kindern und auch bei Erwachsenen schwerwiegende Erkrankungen der unteren Atemwege hervorrufen. Im Kindesalter kann das RS – Virus als mit Abstand häufigste Ursache für Infektionen der unteren Atemwege angesehen werden (Jarti, T., Lehtinen, P., Vuorinen, T., Osterback, R., van den Hoogen, B., Osterhaus, A. D. et al. 2004). Im Vordergrund steht hierbei die Bronchiolitis (Shay, D. K., Holman, R. C., Newman, R. D., Liu, L. L., Stout, J. W.,

& Anderson, L. J. 1999). Insbesondere in der Winterzeit häufen sich Erkrankungen, die ihren Ursprung in Infektionen mit dem RS – Virus, haben. Die Haupterkrankungszeit beginnt in den späten Herbstmonaten und dauert ca. 4 – 5 Monate an (Falsey, A. R. 2007). Das Erkrankungsspektrum reicht von einer Bronchiolitis, die im Säuglingsalter für eine RS – Virusinfektion sehr typisch ist (Bennett, B. L., Garofalo, R. P., Cron, S. G., Hosakote, Y. M., Atmar, R. L., Macias, C. G. et al. 2007), bis hin zu klinisch schwach ausgeprägten, unspezifischen Infektionen bei gesunden Erwachsenen. Schwerwiegende Infektionen im Erwachsenenalter treten vor allem bei Immungeschwächten oder Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen auf (Walsh, E. E. & Falsey, A. R. 2012). Die Infektion mit dem RS - Virus im Erwachsenenalter kann auf Grund des in den Wintermonaten gehäuften Auftretens anderer viraler Erkrankungen ohne spezifische Nachweise klinisch nicht eindeutig diagnostiziert werden (Walsh, E. E. et al. 2012) (Openshaw, P. J. 2005). Insgesamt kann festgestellt werden, dass sowohl Bewohner von Altenheimen und Langzeitpflegeeinrichtungen als auch ein vergleichbares Kollektiv der Gesellschaft außerhalb dieser Einrichtungen eine höhere Morbidität und Mortalität in Bezug auf RSV – Infektionen aufweisen (Walsh, E. E. et al. 2012). Im Rahmen der Antwort des Immunsystems auf eine Infektion der unteren Atemwege mit dem RS – Virus müssen zwei wichtige Komponenten in Betracht gezogen werden. Hierbei ist zum einen die direkte Schädigung der Zielzelle durch das Virus anzumerken. Nach erfolgter Infektion ist es der Zelle nicht mehr möglich, den ursprünglichen Zustand vor Manifestation der Infektion in Bezug auf das Genom und Zellintegrität wiederherzustellen, und somit kommt es zum Absterben der Zielzelle (Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K. H., & Oren, M. 1995). Die zweite Komponente, die in Betracht gezogen werden muss, ist die Antwort des Immunsystems auf die Infektion der Zellen. Im Rahmen der Abwehr der Infektion schüttet die Zelle zahlreiche immunmodulatorische Stoffe (Bueno, S. M., Gonzalez, P. A., Cautivo, K. M., Mora, J. E., Leiva, E. D., Tobar, H. E. et al. 2008), unter anderem Zytokine wie Interferon γ und Tumornekrosefaktor α aus, die die Verbreitung und Infektion weiterer Zellen verhindern und im Verlauf das schädigende RS – Virus eliminieren sollen (Braciale, T. J. 2005). Die Abwehrmechanismen, die im Verlauf dieses Prozesses vom Wirtsorganismus eingesetzt werden, basieren auf Komponenten der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr des Körpers (Lotz, M. T. & Peebles, R. S., Jr. 2012).

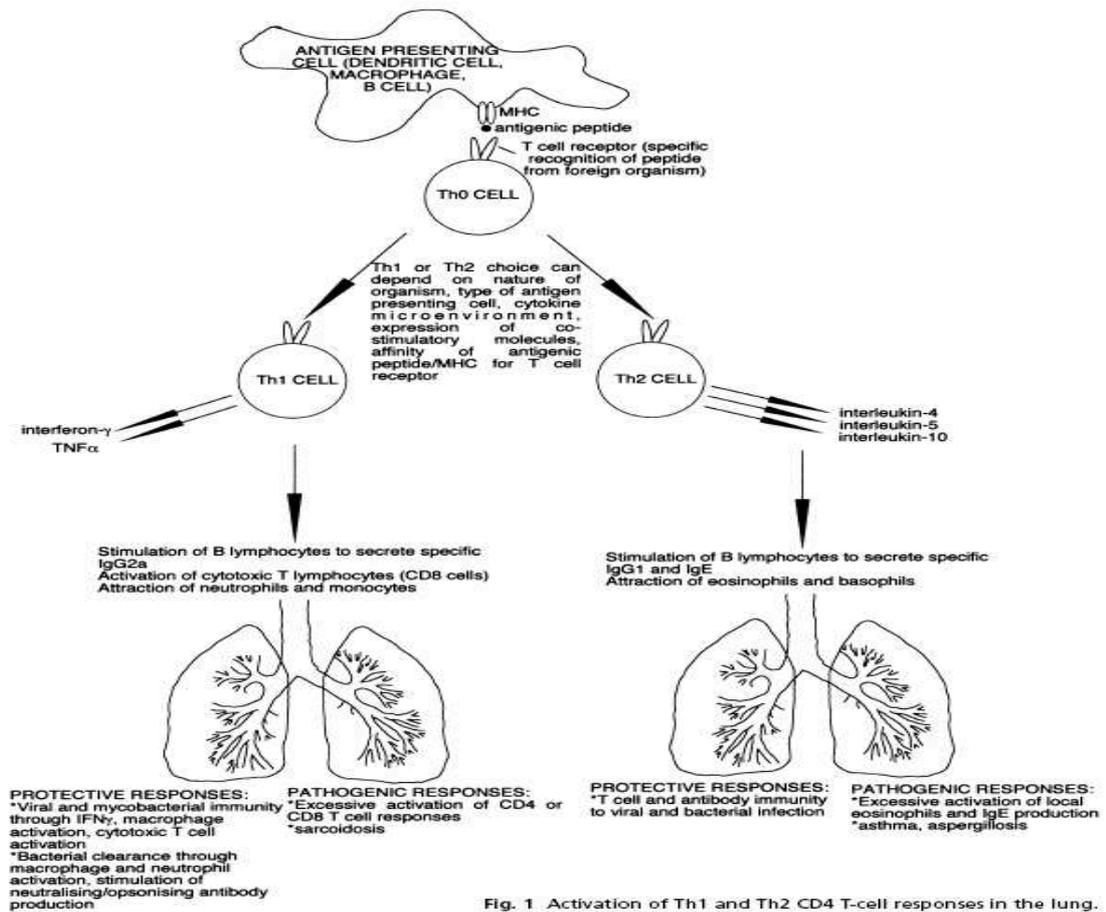
1.13 Allgemeine Reaktion des Immunsystems

1.13.1 Unspezifische Immunantwort

Nach Infektion der Zielzelle mit dem RS – Virus reagiert diese über eine ebenfalls vom diesem benutzte Signalkaskade mit der Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), das einen cytopathogenen Effekt in Hinblick auf die Abwehr des Pathogens erreicht. Es konnte festgestellt werden, dass durch eine hohe Konzentration von endogen produziertem NO die Infektion nicht verhindert werden konnte, die Replikation indessen durch erhöhte Konzentrationen von NO gesenkt wird (Ali-Ahmad, D., Bonville, C. A., Rosenberg, H. F., & Domachowske, J. B. 2003). Im folgenden Verlauf der Infektion greift die unspezifische Immunantwort in den unteren Atemwegen, die im Wesentlichen durch die Gattung der Makrophagen repräsentiert wird, ein. Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die Alveolarmakrophagen. Ihre Aufgabe ist die so genannte „First line of defence“ der zellulären Abwehr zu bilden, indem sie pathogene Stoffe phagozytieren und sie über die Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, unter anderem Sauerstoffradikalen, in ihrem Inneren unschädlich zu machen (Franke-Ullmann, G., Pfortner, C., Walter, P., Steinmuller, C., Lohmann-Matthes, M. L., Kobzik, L. et al. 1995). Eine weitere Eigenschaft ermöglicht es ihnen, über spezifische Rezeptoren auf ihren Membranen, die Fc – Fragmente von Antikörpern zu binden und somit die Phagozytose der markierten Zelle zu erreichen.

Alveolarmakrophagen verfügen auch über die Fähigkeit durch Ausschüttung von Zytokinen (Becker, S., Quay, J., & Soukup, J. 1991) weitere Zellen der Immunabwehr anzulocken. Neben diesen Eigenschaften besitzen sie ebenfalls die Möglichkeit der Antigenpräsentation und ermöglichen so die Einleitung der spezifischen Abwehr durch das zelluläre Immunsystem und die damit verbundenen Abwehr durch B- und T-Lymphozyten und spezifische Antikörper. Zusammengefasst kann man sagen, dass den Alveolarmakrophagen eine wichtige Rolle im Rahmen der initialen Immunantwort zukommt.

1.13.2 Spezifische Immunantwort



British Medical Bulletin 2002;61

7

Abb. 4 Ablauf einer TH-1 und TH-2 getriggerten Immunantwort am Beispiel der Lunge (Boyton, R. J. & Openshaw, P. J. 2002)

1.13.2.1 T – Zell Antwort

Die Aktivierung des spezifischen Immunsystems basiert auf den vorher beschriebenen Mechanismen der unspezifischen Immunantwort. In diesem Rahmen sind besonders die T- und B-Zellen zu nennen. Die T – Zellen werden auf Grund ihrer verschiedenen Cluster of differentiation (CD) in zwei Gruppen unterteilt, die so genannten CD8 positiven cytotoxischen T- Zellen und die CD4 positiven T-Helferzellen. Beide spielen im Rahmen der spezifischen Immunantwort eine tragende Rolle und sind mit für die Ausbildung der Immunantwort gegen das RS – Virus verantwortlich. Die CD 8 positiven T- Zellen sind für die direkte Lyse durch Ausschüttung spezifischer Botenstoffe verantwortlich. In diesem Zusammenhang

dienen sie vor allem der Terminierung der viralen Infektion mit dem RS – Virus (Heidema, J., de Bree, G. J., de Graaff, P. M., van Maren, W. W., Hoogerhout, P., Out, T. A. et al. 2004) (Falsey, A. R. 2007). Die im weiteren Verlauf wichtigen T – Helfer Zellen werden in ihrer Gesamtheit noch mal unterteilt in TH1 Zellen und TH2 Zellen und übernehmen teilweise überlappende, zum Teil aber auch spezielle Aufgaben im Rahmen der spezifischen Immunabwehr (Pinto, R. A., Arredondo, S. M., Bono, M. R., Gaggero, A. A., & Diaz, P. V. 2006). Th1 Helferzellen gelingt es über die Sezernierung bestimmter Botenstoffe zu denen unter anderem TNF α und Interferon γ gehören (Bueno, S. M. et al. 2008), die Stimulierung der B – Lymphozyten zu bewirken und diese zur Produktion von Immunglobulinen des Typs G2 anzuregen. Des weiteren obliegt es ihnen, Makrophagen und cytotoxische T – Zellen über Botenstoffe zum vermehrten Übertritt in die befallene Region zu bewegen. Th2 Zellen obliegt es, identisch zu den vorher beschriebenen Th1 Zellen eine Aktivierung der B- Lymphozyten durchzuführen. In diesem Fall werden über die sezernierten Interleukine 4, 5 und 10 die B-Zellen zu einer Synthese von IgG-1, IgE und IgA angeregt. In welche Richtung sich die Immunantwort des Organismus verschiebt, dass heißt ob sie eher Th-1 oder Th-2- gewichtet ist, ist abhängig von einer Vielzahl von Faktoren.

1.13.2.2 B-Zell Antwort und Bildung spezifischer Antikörper

Die im vorherigen Abschnitt beschriebene Stimulierung der Lymphozyten des Typs B (*bone marrow*) durch T-Helferzellen bewirkt eine spezifische Abwehr der RS – Viren im Organismus. B- Lymphozyten sind in der Lage, durch die Produktion neutralisierender Antikörper eine Infektion des Organismus mit dem RS – Virus zu verhindern. Sie reagieren nach erfolgter Infektion innerhalb von wenigen Tagen mit der Produktion von IgM Antikörpern, einer Unterklasse der Immunglobuline, die zur primären unspezifischen Abwehr des Virus dienen. Aufgrund einer Überlebensdauer von wenigen Wochen werden sie mit Beginn der 2. Woche *post infektionem* von spezifischen IgG Antikörpern abgelöst, die eine gezielte Immunabwehr erlauben.

Die Immunabwehr der Antikörper gegen das RS- Virus richtet sich vor allem gegen die Proteine G und F. Die IgG Antikörper gegen das G Protein gehören bei infizierten Erwachsenen der Subklasse IgG1 und IgG2 an. Die Epitope, die die Antikörper der Subklasse IgG1 binden, sind die Proteine des Virus. Im Vergleich hierzu dienen der Subklasse IgG2 Carbohydrate als Epitope. Die Immunantwort auf

das F – Protein basiert auf einer vornehmlich IgG1 gesteuerten Immunabwehr.

1.14 Reaktion des Immunsystems auf RS – Virus Infektion

Das RS – Virus verursacht im Vergleich zu anderen Erregern von Infektionen der unteren Atemwege keine Zerstörung, vielmehr spielen hierbei die destruktiven Abwehrmaßnahmen des spezifischen Immunsystems eine Rolle. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass der Höhepunkt der klinischen Symptomatik nicht mit dem Zeitpunkt der maximalen Virusreplikation zusammentrifft. Der Höhepunkt der Symptomatik fällt zusammen mit einem vermehrten Vorhandensein und erhöhter Aktivität spezifischer B – und T – Lymphozyten (Openshaw, P. J. 2005). Auf Grund dieses Phänomens kann angenommen werden, dass der Schweregrad der RSV – Infektion abhängig ist vom Vorhandensein spezifischer Immunzellen und somit auch spezifischer Antikörper gegen das RS – Virus. Ebenfalls ist anzunehmen, dass eine frühe Infektion im Kindesalter zu schwereren Verläufen im Adulten führen kann (Culley, F. J., Pollott, J., & Openshaw, P. J. 2002). Eine Infektion in der neonatalen Periode (Periode bis 4 Wochen nach der Geburt) bewirkt eine frühe Prägung des Immunsystems („imprinting“) zu Gunsten einer Th2-vermittelten Antwort und einer geringen Ausschüttung von Interferon γ (Culley, F. J., Pollott, J., & Openshaw, P. J. 2002), das eine schwerwiegende Erkrankung verhindert. Die Immunreaktion mündet somit in einer entsprechend ungünstigen Th2-gewichteten Immunantwort bei Reinfektion.

1.15 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die humorale Immunantwort gegen das RS - Virus in einer Studienpopulation, die 6 Altersdekaden umfasst, zu untersuchen. Die Inzidenz von schwer verlaufenden Erkrankungen der unteren Atemwege, die auf einer Infektion mit dem RS – Virus beruhen, nimmt im höheren Alter wieder zu. Es soll untersucht werden, ob dies auf einer Verminderung der Antikörpertiter mit zunehmendem Alter beruht. Dazu wird in dieser Dissertation die humorale Immunantwort auf Gesamt - Antikörper gegen RSV A und B, neutralisierende Antikörper gegen RSV A und B sowie auf spezifische RSV – F und RSV – N – Antikörper in dem oben genannten Kollektiv untersucht. Aufgrund der hohen Variabilität des RS - Virus und der daraus resultierenden unterschiedlichen Antigenität der Virusstämme werden die Untersuchungen nicht nur mit den jahrzehntealten

Laborstämmen des RSV - A und RSV - B durchgeführt, sondern auch mit RSV - Isolaten der letzten Jahre, die aus der hiesigen Region stammen. Sollten sich dabei Unterschiede in der Reaktivität finden, wirft dies die Frage auf, welche RSV-Varianten man bei seroepidemiologischen RSV-Studien verwenden sollte oder noch weitergehend, ob es überhaupt möglich ist, zuverlässige Aussagen über die Immunität gegenüber RSV in serologischen Testen zu generieren.

2 Material und Methoden

2.1 Liste der verwendeten Materialien

2.1.1 Materialien, arbeitsplatzübergreifend

- Sterile Einmalpipetten Costar, Corning, USA
5 ml, 10 ml und 25 ml Pipettiervolumen
- Einkanalpipetten Eppendorff, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen Starlab, Ahrensburg, Deutschland
- 1.5 ml-Reaktionsgefäße Eppendorff, Hamburg, Deutschland
- Kryoröhrchen Nunc, Wiesbaden, Deutschland

2.1.2 Zellkultur und Virusisolierung

2.1.3 Zellkulturgefäße/-geräte

- Zellkulturflaschen Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Nunclon™ 25 cm², 75 cm² und 175 cm² Bodenfläche
- 96-well-Mikrotiterplatten TPP, Trasadingen, Schweiz
- 24-well-Zellkulturplatten TPP, Trasadingen, Schweiz
- Zentrifugenröhrchen Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
15 ml Gefäß
- Zentrifugenröhrchen Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
50 ml Gefäß
- Sterile Zellschaber Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
- Sterilfilter Whatman, Kent, UK
- Einmalspritzen Braun, Melsungen, Deutschland
- Pasteurpipetten Brand, Wertheim, Deutschland
- Mehrkanalpipette Eppendorff, Hamburg, Deutschland
- Multipette Eppendorff, Hamburg, Deutschland
- Combotips für Multipette Eppendorff, Hamburg, Deutschland
- Neubauerzählkammer Welabo, Düsseldorf, Deutschland
- Megafuge 1.0 Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- Vakuumpumpsystem Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
- Mikroskop Leitz, Wetzlar, Deutschland
Diavert
- Inkubator Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
BBD-6220
- Werkbank Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
HERAsafe
- Einfriercontainer Nalgene Labware, Rochester, NY, USA

- Vortexer

VWR, Darmstadt, Deutschland VV3

2.1.4 Zellkulturmedien

- DMEM GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- FCS GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- Penicillin/Streptomycin GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
10.000 U/ml
- Gentamycin GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
10 mg/ml
- Moronal-Nystatin Wyeth-Lederle Phama, Wien, Österreich
- Fungizone GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- L-Glutamine GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- PBS-Puffer pH 7,3 GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- 0,5% Trypsine-EDTA GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- Dimethylsulfoxid (DMSO) GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- Trypsin acetyliert Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
- Sputasol Oxoid, Hampshire, UK

2.1.5 Antikörper

- Mouse anti – RSV Fusion Protein
- Anti – Mouse – IgG HRPO

2.1.6 Chemikalien/Medien

- Sucrose
- Methanol
- *Aceton*
- *Tween 20*
- *BSA*
- *Phosphat citrat buffer*
- *O-phenylene dihydrochloride*
- *H₂SO₄*
- *Bradford Reagenz*
- *Na₂CO₃*
- *NaHCO₃*

2.1.7 Kits

- INGENASA Testkit

2.1.8 Geräte

- Photometer Pharmacia, Biotech, Freiburg, Deutschland
GeneQuant II
- Ultrazentrifuge Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
J2-21
- Zentrifuge Eppendorff, Hamburg, Deutschland
5417-R

2.2 Methodik

2.2.1 Zusammenstellung des Studienkollektivs

Das Kollektiv basiert auf einer randomisierten Zusammenstellung von 15 Seren jeder Altersdekade, die der Serenbank des Instituts für Virologie der Heinrich Heine Universität entnommen wurden. Eine Vorauswahl hinsichtlich des Geschlechtes wurde nicht vorgenommen. Insgesamt wurden 90 Seren untersucht. Immunsupprimierte Patienten sowie Patienten, die Transplantate oder Blutprodukte erhalten haben, wurden ausgeschlossen.

2.2.2 Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer

Der Zellrasen wurde durch Zugabe von Trypsin – EDTA gelöst und in 10 ml PBS aufgenommen. Die Suspension wurde resuspendiert und in ein Falcon – Röhrchen überführt. Im folgenden Schritt wurden 20µl Zellsuspension der Zellsuspension entnommen und in die Neubauzählkammer gegeben.

Durch die Auszählung der vier Großquadrate wurde die in der Suspension befindliche Gesamtzellzahl unter Bildung des Mittelwerts bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension zusammen mit dem Medium gemischt und in einem standardisierten Verhältnis auf das Zellkulturgefäß ausgesät. Die Einsaat erfolgte in einer Zelldichte von ca. 3×10^4 Zellen/cm².

2.2.3 Einfrieren von Zellen

Nachdem der Zellrasen hinsichtlich seiner Konfluenz und Zellmorphologie unter dem Lichtmikroskop kontrolliert wurde, konnte der Prozess des Einfrierens beginnen. Es wurden ohne Ausnahme Zellen mit einer einwandfreien Zellmorphologie und mit einer Konfluenz des Zellrasens von 100% eingefroren.

Der Zellrasen wurde mit 0,5 % Trypsin abgelöst und in 10ml DMEM mit 10% FKS aufgenommen. Hierauf folgte eine 10minütige Zentrifugation bei 600 rpm (Megafuge 1.0). Das entstandene Zellpellet wurde in Einfriermedium überführt (DMEM/10%FKS/10%DMSO) und in eigens für diesen Vorgang auf 4°C vorgekühlte Einfrierampullen verteilt. In jede Ampulle wurde 1ml Zellsuspension gegeben. Die Einfrierampullen wurden im Einfriercontainer platziert und zunächst für 24 h bei -80°C gelagert. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff bei -180° C archiviert.

2.2.4 Auftauen von Zellen

Um ein einwandfreies Auftauen der tiefgefrorenen Zellen zu gewährleisten, wurden zunächst 10ml Medium (DMEM/10%FKS) in einem 50-ml-Falcongefäß bei 37°C vorgewärmt, bevor das tiefgefrorene Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank, der mit flüssigem Stickstoff gefüllt war, entnommen wurde und das Kryoröhrchen in ein auf 37°C vorgewärmtes Wasserbad überführt wurde. Es schloss sich eine 10 minütige Zentrifugation bei 600 rpm (Megafuge 1.0) an. Der bei der Zentrifugation entstandene Überstand wurde verworfen, das entstandene Zellpellet in 20 ml des vorher auf 37°C aufgewärmten Mediums (DMEM/10%FKS) resuspendiert und in eine 75 cm² –Zellkulturflasche überführt. Diese wurde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.5 Virusinfektion von Zelllinien

Virus	Abkürzung	Stamm	Jahr der Isolierung	Herkunft	Susceptible Zelllinie
RSV Subtyp A	RSV A (Typ A), GA1	Long strain	1962?	M.A. Bioproducts; Nr.: 30-875 J	HEp-2
RSV Wildtyp 2589/04	RSV 2589 (Typ A), GA2		2004		HEp-2
RSV Wildtyp 10615/07	RSV 10615 (Typ A), GA2		2007		HEp-2
RSV Subtyp B	RSV B	RSVB Wash/ 18537/62	1962	ATCC; Nr: VR-1580™	HEp-2
RSV Wildtyp 211	RSV211 (Typ B)		2002		HEp-2
RSV Wildtyp 1365	RSV1365 (Typ B)		2007		[HEp-2] nicht stabil*

Tabelle 1 : Verwendete Referenzviren * Virusisolat war nur in wenigen Passagen kultivierbar

2.2.6 Virusinfektion

Eine T-75-Zellkulturflasche deren Zellrasen zu ca. 30% konfluent war wurde mit virushaltigem Zellkulturüberstand infiziert. Das Virusinokulum wurde in 1-ml-Aliquots, die zuvor bei -80°C gelagert wurden, in einem Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach Zugabe von 4 ml PBS wurde das Virusinokulum auf ein Gesamtvolumen von 5ml aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 50µl Trypsin – Stocklösung, bis eine Endkonzentration von 2,5 µg/ml erreicht wurde.

Der Zellrasen der empfänglichen und zu beimpfenden Zelllinie wurde nach Dekantierung des Zellmediums unter Zugabe von 5ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 5ml Virusinokulum in die vorher vorbereitete T75 Zellkulturflasche pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C durch fortlaufendes Bewegen auf dem Kippschüttler inokuliert. Danach wurde die Virussuspension mittels PBS ausgewaschen und somit vom Zellrasen entfernt. Hierauf folgte die Zugabe von 20ml 2% Erhaltungsmedium (Dulbecos MEM + 2% FKS + 5ml Pen – Strep), woraufhin die T75 Zellkulturflasche im Brutschrank bei 33°C und einem konstanten CO₂ Gehalt von 5% inkubiert wurde, bis ein cytopathischer Effekt identifiziert werden konnte.

2.2.7 Cytopathischer Effekt und Virusernte

Die inokulierten T75 Zellkulturflaschen wurden einer täglichen Kontrolle hinsichtlich der charakteristischen Fusionen mittels Lichtmikroskop unterzogen. Nach einer Beobachtungszeit von 2 – 4 Tagen konnte in der Regel ein positiver CPE (cytopathischer Effekt) festgestellt werden. Es schloss sich eine Überführung des Zellüberstandes in ein 50ml Falcongefäß und eine daraufhin folgende Portionierung mittels steriler Einmalpipetten in zuvor beschriftete 1ml – Aliquots an. Diese wurden nun bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. VI 1365 war für die Herstellung zu ELISA - Ag geeignet, bei der anschließenden Verwendung für den N - Test aber instabil, daher wurde dieses Isolat hier ausgeschlossen.

2.2.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Durchführung der Quantifizierung des Proteingehalts der infizierten Zellkulturüberstände als Vorbereitung für die folgenden Testungen durch ELISA wurden standardisierte, im Labor vorhandene BSA – Standards bei Raumtemperatur aufgetaut. Die verwendeten BSA - Standards entsprachen vorher festgelegten

Konzentrationen.

Nr.	Endkonzentration $\mu\text{g/ml}$
1	0
2	20
3	40
4	60
5	80
6	120

Tabelle 2 : Konzentration der verwendeten BSA - Standards

Nach Vorbereitung und Auftauen der BSA – Standards wurden jeweils 2 infizierte Zellkulturüberstände zweier verschiedener RSV – Typen ebenfalls bei Raumtemperatur aufgetaut. Zum gleichen Zeitpunkt wurde ein Zellüberstand von nicht infizierten Zellen aufgetaut, der in diesem Versuchsaufbau als Kontrollantigen fungiert, und somit die Reliabilität des Ergebnisses bestätigen soll. Die aufgetauten infizierten Zellüberstände als auch das vorbereitete Kontrollantigen wurden nach folgendem Schema in 1,5ml Reaktionsgefäßen 1:20 und 1:40 verdünnt:

	Antigen	H2O	Verdünnung	Endvolumen
1	10	190	1:20	200
2	20	780	1:40	800
	Kontrollag.	H2O	Verdünnung	Endvolumen
3	10	190	1:20	200
4	20	780	1:40	800

Tabelle 3 : Verdünnungsschema der Proteinbestimmung nach Bradford

Es schloss sich eine Verdünnung der zu verwendenden Bradford - Lösung in einem Verhältnis von 1:5 an. Zur Verdünnung wurde destilliertes Wasser benutzt, um eine etwaige Verunreinigung der Lösung zu verhindern. Die so entstandene verdünnte Bradford – Lösung wurde in ein nicht durch Proteinrückstände kontaminiertes „Wannengefäß“ gegeben und unter Zuhilfenahme einer Einkanalpipette in eine 96 well – Microtiterplatte überführt. In jedes Well der Reihen der Spalten 1 und 2 wurden jeweils 200 μl Bradford – Reagenz eingeführt. Die Proben und Standards wurden nach folgendem Schema hinzugeben.

Standard 1 (0)	Standard 1 (0)
Standard 2 (20)	Standard 2 (20)
Standard 3 (40)	Standard 3 (40)
Standard 4 (60)	Standard 4 (60)
Standard 5 (80)	Standard 5 (80)
Standard 6 (120)	Standard 6 (120)
Infizierter Zellüberstand (1:20 verdünnt)	Infizierter Zellüberstand (1:40 verdünnt)
Infizierter Zellüberstand (1:20 verdünnt)	Infizierter Zellüberstand (1:40 verdünnt)

Tabelle 4 : Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Proteinsgehalts

Die 96 well Mikrotiterplatte wurde im Anschluss photometrisch mittels SLT – Photometer ausgewertet und dokumentiert.

2.2.9 Herstellung und Vorbereitung von RSV – ELISA – Platten

Zunächst wurde ein Beschichtungspuffer hergestellt, der eine adäquate Adhäsion der im weiteren Verlauf zu verwendenden RSV – Zelllysate auf dem Boden der 96 - Well Mikrotiterplatte gewährleisten sollte. Der Beschichtungspuffer („Coating Buffer“) wurde durch ein Zusammenführen von 1,59g Na₂CO₃ mit 2,93g NaHCO₃ auf 1l Aqua dest. hergestellt. Die Proteinlösung aus Virus/Zelllysate wurden auf eine Konzentration von 3µl/ml in Coating – Buffer verdünnt. Das zu wählende Mischungsverhältnis konnte im vorherigen Schritt mittels Bradford – Proteinbestimmung (1.1.2.3) austitriert und bestimmt werden. Anschließend wurde die Lösung mittels 8 – Kanal Pipette nach einem vordefiniertem Schema in eine 96 – Well – Mikrotiterplatte pipettiert.

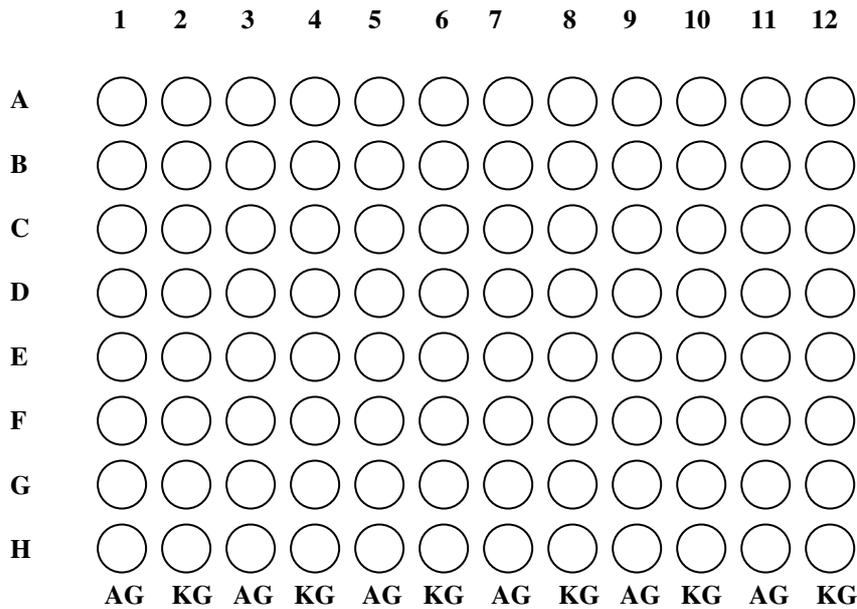


Abb. 4 : Pipettierschema zur Herstellung von Elisa – Platten (AG = RSV infizierte Zelle; KG = Kontrollantigen)

Nach erfolgter Beschichtung wurden Platten bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Vorbereitung auf die weiteren Arbeitsschritte begann die Herstellung der Blocklösung, die durch ein Zusammenfügen von 5ml FKS und 2ml BSA in 100ml PBS hergestellt werden konnte. Der Überstand der am Vortag inkubierten Zellplatten wurde am nächsten Tag entfernt. Anschließend wurden 150µl des Blockierungspuffers unter Zuhilfenahme einer 8 – Kanal – Pipette in jedes Well der Platte hinzugefügt. Es schloss sich nun eine weitere Inkubationsphase von 60 Minuten bei Raumtemperatur an. Die Inkubationszeit konnte zur Herstellung eines Waschpuffers genutzt werden. Dieser bestand aus 10 Tabletten PBS (Phosphat Buffered Saline) und 5ml Tween 20 auf 1Liter aqua dest. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurden die Platten entleert und anschließend zweimal mit jeweils 200µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Der Waschpuffer wurde entfernt. Nach Trocknung der Platten wurden diese sofort weiterverarbeitet oder verpackt und bei 4°C gelagert.

2.2.10 Nachweis der Antikörper

Im Folgenden wird die Methode beschrieben, durch die die spezifischen RS – Virus Antikörper nachgewiesen wurden. Der Nachweis erfolgte durch einen Enzym – Linked – Immuno – Assay, im weiteren Verlauf ELISA abgekürzt. Der ELISA basiert auf einer auf Vorhandensein von Antikörpern in Seren der getesteten

Personen, d.h. im Serum des getesteten Patienten befinden sich spezifische Antikörper, die an einer zuvor mit RSV – Antigen beschichteten Zellkulturplatte, welche als Festphase dient, anheften und dadurch einen Antigen – Antikörperkomplex bilden. Der eigentliche Nachweis des Antigen – Antikörperkomplexes erfolgt mittels einer enzymatischen Reaktion, die je nach Ausprägung und Anzahl der Komplexe einen entsprechenden Farbumschlag erzeugt. Dazu wird eine mit Virusantigen beschichtete Zellkulturplatte mit dem zu testenden Patientenserum inkubiert. Die im Serum vorhandenen Antikörper verbinden sich mit Virusantigen zu einem festen Antigen – Antikörper – Komplex. Es folgt eine Waschung zur Eliminierung der nicht gebundenen Antikörper, um eventuelle Kreuzreaktionen, die das Ergebnis verfälschen, auszuschließen. Im nächsten Schritt wird durch die Hinzugabe eines Sekundärantikörpers mit enzymatischer Aktivität (Peroxidase), der gegen den Fc – Abschnitt der IgG bzw. IgM Antikörper gerichtet ist, die Bildung des Antigen – Antikörperkomplexes nachgewiesen. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die Zugabe von Substrat, das durch die Umsetzung des Substrats, den Nachweis von spezifischen Antigen – Antikörperkomplexen durch einen Farbumschlag sichtbar macht. Zur Beendigung der Enzym-Substratreaktion wird schließlich Stopplösung (z.B. H₂SO₄) hinzugefügt.

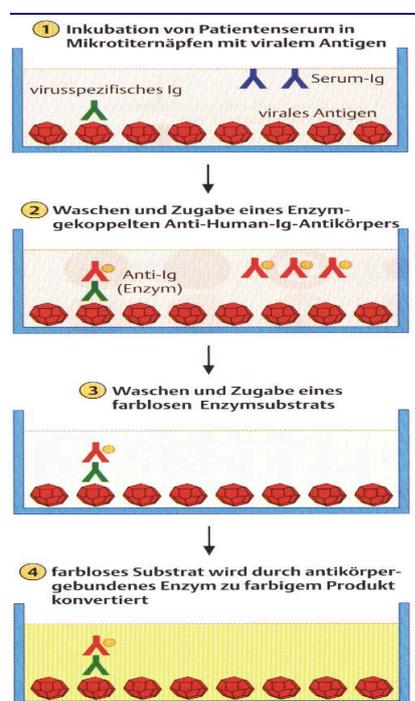


Abb. 5 : Funktionsprinzip eines ELISA-Tests Quelle: Hof et al. Mikrobiologie, Duale Reihe, Thieme Verlag, 2000

Die Auswertung des Tests erfolgt durch eine photometrische Messung der Extinktion des Farbumschlages bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels eines Photometers.

2.2.11 Durchführung des Antikörpernachweises im ELISA

Nachdem die Beschichtung der 96 – Well – Platten erfolgt war, wurde im anschließenden Schritt ein Verdünnungspuffer hergestellt. (s. Tab. 5)

NaCl	8,77g
BSA	1,00g
EDTA	0,34g
Tween20	0,50ml
Tris-Base	7,90g
aqua dest.	ad 1000ml

Tab. 5 : Zusammensetzung des Verdünnungspuffers

Die Bestandteile wurden in aqua dest. gelöst und anschließend mittels HCl auf einen pH – Wert von 7,4 eingestellt. Der Verdünnungspuffer wurde direkt verarbeitet und anschließend bei 4°C gelagert. Zur Durchführung des ELISA's wurde im Anschluss eine Verdünnungsreihe nach folgendem Schema erstellt.

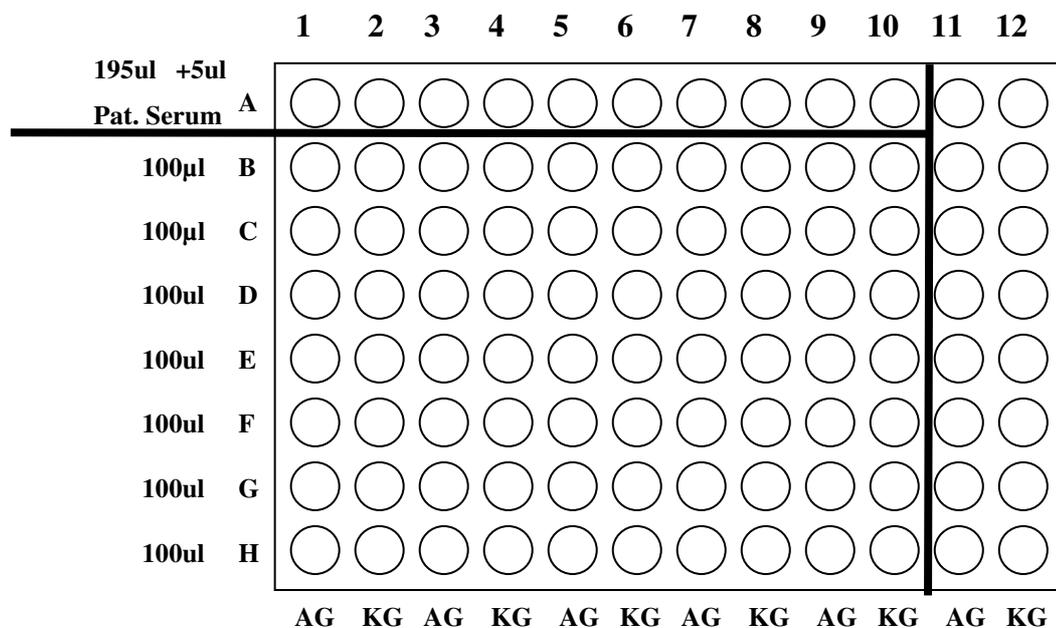


Abb. 4 :Schema der Verdünnungsreihe des ELISA

Im folgenden Schritt wurden in Reihe A in jedes Well 195µl Verdünnungspuffer einpipettiert und im Anschluss 5µl Patientenserum hinzugefügt. In Reihe 11 und 12 wurde kein Patientenserum hinzugefügt, da diese Reihen als Negativkontrolle dienten. Nun erfolgte die Erstellung einer Verdünnungsreihe durch jeweilige Entnahme von 100µl aus dem vorherigen Well, so dass nach Erstellung der Verdünnungsreihe sich in jedem Well ein Volumen von 100µl befindet. Die Platte wurde im Anschluss nach dem Prinzip der feuchten Kammer bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Nach Ablauf einer Inkubation von 1 Stunde wurde jedes Well der 96 –Well – Platte dreimal mit 250µl Waschpuffer gewaschen. Die Herstellung der Lösung des Zweitantikörpers erfolgte nach vollständiger Entfernung des Waschpuffers. Zu diesem Zweck wurden 0,5µl des Anti – Mouse – IgG-HRPO in 20ml Verdünnungspuffer verdünnt (1:20.000). Anschließend wurden 100µl des verdünnten Puffers pro Cup der 96 – Well Platte hinzugeben. Es schloss sich eine einstündige Inkubation bei 37°C nach dem Prinzip der feuchten Kammer an. Zu jeder Versuchsreihe wurde eine schriftliche Dokumentation geführt. Kurz vor Ablauf der 60 minütigen zweiten Inkubationsphase wurde das Substrat vorbereitet. Hierzu wurde eine Kapsel Phosphat – Citrat – Buffer geöffnet und deren Inhalt in einen 100ml Erlenmeyerkolben eingefüllt. Es schloss sich eine Zugabe von einer Tablette Phenylenediamine – Dihydrochlorid an. Die Reagenzien wurden zusammen in 100ml *aqua dest.* aufgelöst. Die Platten wurden nach Ablauf der Inkubationszeit einer erneuten dreimaligen Waschung mit 250µl Waschpuffer unterzogen. Das Substrat wurde in einer Menge von 100µl in jedes Cup pipettiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Inkubation für 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zum Schluss erfolgte die Zugabe von Stopplösung, die aus 1M H₂SO₄ bestand. Es erfolgte eine visuelle und photometrische Kontrolle des Farbumschlags. Es zeigte sich eine spezifische Fluoreszenz, die eine gelbliche Farbe annahm, welche je nach Konzentration der AK – Bindung sich in den Verdünnungsreihen abschwächte. Die Negativkontrolle zeigte auf Grund der nicht vorhandenen AK – Bindungsstelle keine spezifische Fluoreszenz.

2.2.12 Vorbereitung von 96-well-Zellkulturplatten zur Quantifizierung des Virusgehaltes mittels TCID₅₀

Eine 96-well-Mikrotiterplatte wurde mit einer vordefinierten Zellmenge von Hep2 - Zellen beschichtet. Hierzu wurde der Zellrasen einer konfluenten T – 75

Zellkulturflasche mit HEP – 2 – Zellen verwendet, die zuvor zur Ablösung der Zellen mit Trypsin behandelt wurde. Die durch diesen Vorgang abgelösten Zellen wurden in 10ml Dulbeccos MEM aufgenommen. Hieran schloss sich eine Zählung des Zellgehaltes in der Neubauer-Zählkammer an. Die Zellen wurden in einer Endkonzentration von 5×10^4 Zellen pro ml zum Medium gegeben. In jedes Well der 96-well-Mikrotiterplatten wurden 100µl Zellsuspension pro Cup mittels Multipette hinzugefügt. Die so präparierten Platten wurden über Nacht bei 37°C im CO₂ - Brutschrank inkubiert bis zu einer optimalen Zelldichte von ca. 30%.

2.2.13 Durchführung des TCID₅₀

Die in Schritt 2.2.3 bei -80°C gelagerten Aliquots mit verschiedenen RSV – Subtypen wurden durch Erwärmen bei Raumtemperatur gebrauchsfertig gemacht. Im Anschluss des Auftauvorgangs wurden sterile 96 – well – Zellkulturplatten zur Erstellung einer Verdünnungsreihe vorbereitet. Die Wells wurden zunächst mit 180µl Dulbecos MEM mit 10% Kälberserum (FKS) befüllt. Es folgte die Erstellung der Verdünnungsreihe mit den Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-9} . In Well Nr. 1 wurde 20µl des Inokulums hinzugefügt. Nach mehrmaligem Aspirieren entstand eine Verdünnung von 10^{-1} . In den folgenden Schritten wurde nun jeweils 20µl des vorangegangenen Wells in das folgende Well übertragen. Es entstand in Well 2 somit eine Verdünnung von 10^{-2} . Dieser Vorgang wurde bis Well Nummer 9 fortgeführt, wo rechnerisch dann eine Verdünnung von 10^{-9} vorliegt. Um eine Kontaminierung der folgen Cup – Reihe zu verhindern, wurden bei jedem Pipettiervorgang neue Pipettenspitzen verwendet.

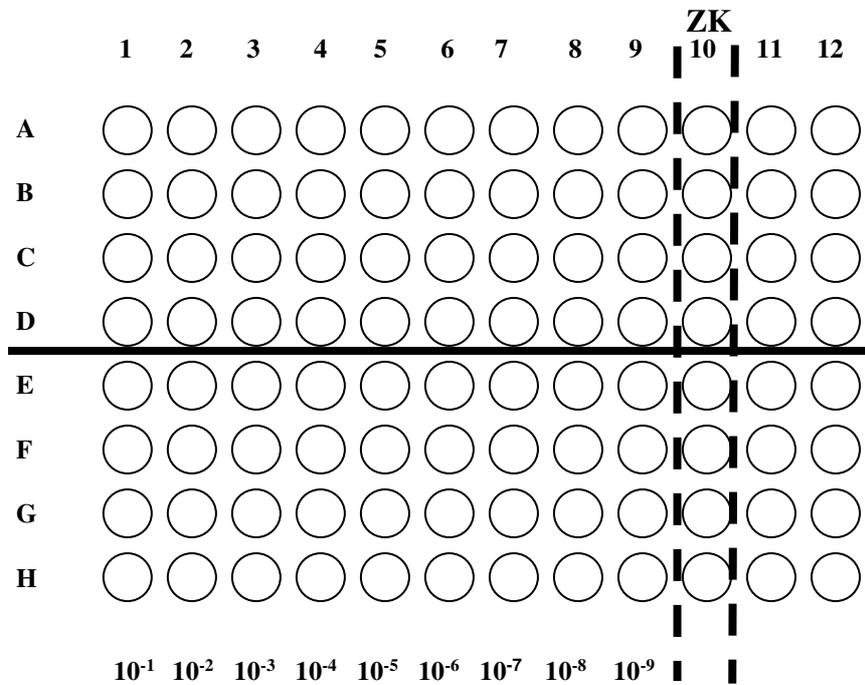


Abb. 5 : Pipettierschema und Verdünnungsschema des TCID₅₀

Im folgenden Schritt wurden die bei 37°C inkubierten subkonfluenten Zellkulturplatten zur Verwendung vorbereitet. Das überschüssige Medium wurde abgesaugt und durch Erhaltungsmedium (Dulbecco MEM + 2%FKS) ersetzt. Anschließend wurden 100µl des Inokulums der Mutterplatte in die vorbereitete Zellkulturplatte überführt. Durch Pipettieren von Spalte 10 in Richtung Spalte 1 wurde ein Pipettenwechsel vermieden.

Die Zellkultur wurde anschließend für 2-3 Tage im CO₂-Schrank bei 37°C inkubiert. Es schloss sich eine tägliche visuelle lichtmikroskopische Kontrolle jedes einzelnen Cups auf das Vorhandensein eines CPE an. Die TCID₅₀ Konzentration wurde als die Verdünnung definiert, bei der mindestens 2 der 4 Ansätze einen CPE aufweisen.

2.2.14 RSV – Antigennachweis in infizierten HEP – 2 Zellen mittels RSV – Neutralisationstest

Die Durchführung des RSV – Neutralisationstests benötigte zunächst die Vorbereitung einer Zellkulturplatte. Dazu wurde eine T75 – Zellkulturflasche mit 30% konfluenten HEP – 2 Zellen zunächst mit DPBS gewaschen und im Anschluss mit 2ml Trypsin behandelt, um ein Ablösen der Zellen zu erleichtern.

Durch mehrfaches Schwenken der Zellkulturflasche konnte eine adäquate Verteilung des Trypsin gewährleistet werden. Es schloss sich eine vollständige Entfernung des Trypsin an. Nach einer Inkubationszeit von 10min bei 37°C im CO₂ - Schrank wurden zu den abgelösten Zellen 10ml Dulbeccos MEM hinzugefügt. Die

wiederholte Reaspirierung erfüllte die Zwecke einer optimalen Verbindung von Zellen und Medium. Die auf diesem Wege entstandene Zellsuspension wurde im folgenden Schritt unter Zuhilfenahme der Neubauer – Zählkammer auf ihren Zellgehalt hin überprüft. Basierend auf dem Ergebnis der Zählung wurde nun die Zellkonzentration, die zuvor als Standards festgelegt wurde, bestimmt und anschließend auf eine Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml gebracht. Als Nährmedium wurde Dulbecos MEM eingesetzt, das mit einem Zusatz von 10% FKS versehen war.

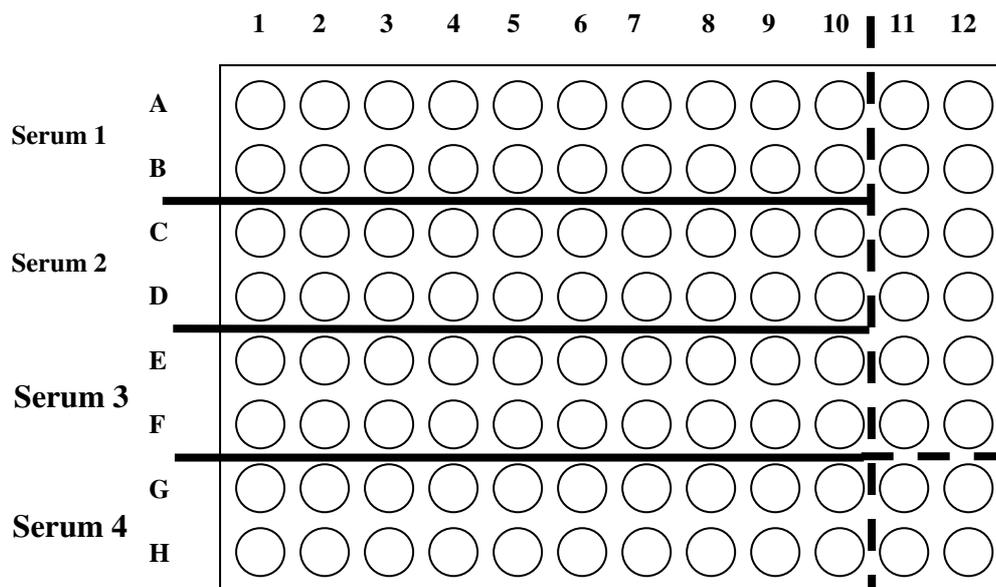


Abb. 6 : Pipettierschema und Verdünnungsreihe des Neutralisationstests

In eine 96 – Well Zellkulturplatte wurde pro Well jeweils 100µl der entstandenen Zellsuspension mittels einer Multipipette hinzugefügt. Die Platten wurden bis zum folgenden Tag bei 37°C im CO₂ - Schrank inkubiert. Zur weiteren Durchführung wurde am nächsten Tag eine Verdünnung des jeweiligen Virus – Inokulums gemäß dem in Schritt 2.2.13 ermittelten TCID₅₀ – Wertes eingeleitet. Die Zielverdünnung wurde zwei 10er – Potenzen niedriger gewählt als die ermittelte TCID₅₀ Konzentration. Die Platten wurden im Anschluss nach folgendem Schema hergestellt. Im weiteren Verlauf wird diese Platte als Mutterplatte bezeichnet.

In die Wells 1 - 10 wurde 100µl des vorbereiteten Virusinokulums hinzugefügt. Die Wells A11 und A12 dienen der Virusrücktitration und wurde mit jeweils 20µl Virusinokulum versehen. An diesen Vorgang schloss sich eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur an. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte das

Medium aus den am Vortag vorbereiteten Zellkulturplatten abgesaugt und durch 100µl Dulbeccos MEM ersetzt werden, das mit 2% FKS versehen wurde und somit als Erhaltungsmedium diente. Es folgte die Überführung des Inhalts der Mutterplatte in die präparierten Zellkulturplatten. Die Platten wurden unter täglicher visueller Kontrolle mit dem Lichtmikroskop für 4-5 Tage im CO₂ - Schrank inkubiert. Das optisch verifizierte Vorhandensein eines cytopathogenen Effektes führte zu weiteren Schritten.

2.2.15 RSV – Antigennachweis in infizierten HEP – 2 Zellen mittels ELISA

Das Medium der in Schritt 2.3.2 hergestellten Platten wurde nach optischer Feststellung eines cytopathischen Effekts abgesaugt. Jedes Well wurde im Anschluss mit jeweils 200µl PBS gewaschen. Bis zu diesem Zeitpunkt waren die Platten noch als infektiös zu behandeln. Dieser Umstand machte eine Fixierung der Platten mit einer Aceton Methanol – Lösung im Verhältnis 1:1 notwendig. Darüber hinaus bewirkt die Fixierung, dass das Antigen fest an der Plastikoberfläche gebunden wird. In jedes Well wurde 200µl der bei -20°C gelagerten Lösung hinzugefügt. Für eine Zeit von 10 Minuten wurde die Platte mitsamt Inhalt bei -20°C inkubiert. Nach Ablauf der Wartezeit wurde die überschüssige Fixierungslösung dekantiert. Die Platten waren von nun an nicht mehr infektiös, was eine Weiterverarbeitung ohne sterile Werkbank ermöglichte. Die noch aktiven, aber nicht mehr infektiösen Platten wurden im Anschluss mit einem vorher hergestellten Waschpuffer gewaschen. Durch eine Zusammenführung von 20 Tabletten PBS und 10ml Tween 20 auf 1l aqua dest. entstand eine Lösung, die im weiteren Verlauf als Waschpuffer 2 benannt wird. Es folgte eine einmalige Waschung der Platten mittels Waschpuffer 2, an die sich nach Dekantieren die Blockierung der Platten anschloss. Als Blockierungslösung wurde eine Zusammensetzung aus 2,5ml FKS in Kombination mit 1g BSA in 50ml PBS hergestellt. In jedes Cup der 96 – Well - Platte wurden 200µl Blockierungslösung pipettiert. Die hier angegebenen Mengen dienten der Blockierung von 2 Platten. Auf die Blockierung folgte eine 1-stündige Inkubationsphase auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Hierbei konnte eine optimale Verteilung der Blockierungslösung in jedem Cup erreicht werden. Im Zuge der einstündigen Wartezeit wurde der für den weiteren Verlauf benötigte Verdünnungspuffer hergestellt. Als Verdünnungspuffer für die weiteren Schritte diente eine Kombination aus 2,5ml FKS, die zusammen mit 250µl Tween 20 in 50ml PBS aufgelöst wurden. Die hier angegebenen Mengen

dienten der Bearbeitung von 2 Platten. 10 Minuten vor Ablauf der einstündigen Inkubationszeit wurde die Verdünnung des 1. Antikörpers vorbereitet. Als 1. Antikörper diente der Mouse anti-RSV Fusion Protein (Serotec MCA 490). 25µl dieses Antikörpers wurden 20ml des vorher hergestellten Verdünnungspuffers hinzugefügt. Nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit erfolgte eine 3-malige Waschung mit Waschpuffer 2 und nach Entfernung des Waschpuffers wurden 100µl der vorher hergestellten Verdünnung des 1. Antikörpers in jedes Cup pipettiert. Es schloss sich eine weitere einstündige Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf dem Schüttler an. Kurz vor Ablauf der 2. Inkubationsphase wurde der für den nächsten Schritt zu verwendende 2. Antikörper vorbereitet. In diesem Versuchsaufbau diente als 2. Antikörper Anti-Mouse- IgG HRPO (Amersham NA9310V), der 1:1000 verdünnt wurde. Zur Gewährleistung einer adäquaten Verdünnung diente eine Zusammenführung von 20µl Konjugat auf 20ml Verdünnungspuffer. Das Hinzufügen von 100µl des 2. Antikörpers machte eine weitere einstündige Inkubationszeit bei Raumtemperatur erforderlich. Nach Beginn der Inkubationszeit begann die Vorbereitung des Substrats. Zunächst wurde eine Kapsel Phosphat – Citrat – Buffer mit Natriumperborat (Sigma P-4922) in 100ml aqua dest. aufgelöst. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde, parallel zur erneuten dreimaligen Waschung der Platten mittels Waschpuffer zur Phosphat – Citrat – Buffer Aqua dest. -Lösung eine Tablette o-Phenylene dihydrochloride 30mg (Sigma P8412) hinzugefügt. Nachdem die Waschung abgeschlossen und die Tablette vollständig aufgelöst war, wurden pro Cup jeweils 100µl des Substrats hinzupipettiert. Es schloss sich eine Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur an. Die Inkubationszeit wurde genutzt, um eine Stopplösung, bestehend aus 1M H₂SO₄ herzustellen. Nach 10 Minuten wurden 50µl Stopplösung pro Cup der 96 – Well – Platte hinzugegeben. Der zu beobachtende Farbumschlag wurde bei einer Extinktion von 490nm im Photometer gemessen und dokumentiert.

2.2.16 Nachweis von RSV-F und RSV – N Antikörpern in Patientenseren mittels ELISA

Zum Nachweis von RSV – F bzw. RSV – N Antikörpern wurde das Testkit der Firma INGENSA verwendet. Die verwendeten Seren wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß 1:20 vorverdünnt. Dazu wurden 2µl des zu testenden Serums mit 38µl des im Testkit enthaltenen Diluent 01 zusammengebracht. Das verdünnte

Serum wurde im Anschluss in die im Testkit enthaltenen beschichteten Platten einpipettiert. Es wurde eine 3-fach-Verdünnungsreihe über 4 Titerstufen hergestellt. Die Verdünnungsreihe wurde wie folgt hergestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Puffer	Serum (1:20)
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	135	15
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	100	50
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	100	50
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		

Abb. 7 : Pipettierschema zum Nachweis von N – und F – Protein durch ELISA

Die Reihen A – D der Spalte 1 dienten als Positivkontrolle und wurden nicht mit Serum versetzt. Hier wurde ein RSV – N bzw. RSV – F Antikörper hinzugefügt, der bereits im Test – Kit funktionsfähig vorhanden war. Die Reihen E – H dienten analog als Negativkontrolle und wurden mit RSV – N bzw. RSV – F Antikörper versetzt, der ebenfalls bereits im Testkit vorhanden war. Nachdem die Kontrollen und das verdünnte Serum nach obigem Schema hinzugefügt wurden, schloss sich eine einstündige Inkubationsphase bei Raumtemperatur an. Danach wurden die Platten 3mal mit der im Testkit vorhandenen Waschlösung gewaschen. Zur weiteren Vorbereitung wurden 5,5µl des im Testkit enthaltenen Konjugats (Goat – Anti – human –IgG) mit 11ml Verdünnungspuffer zusammengefügt. In jedes Cup wurden im Anschluss 100µl der Lösung hinzupipettiert. Es schloss sich eine weitere Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur an. Eine erneute dreimalige Waschung erfolgte nach Ablauf der zweiten Inkubationsphase. Nach Entfernung des Waschpuffers wurde das im Testkit enthaltene Substrat in einer Menge von 100µl per Cup hinzupipettiert. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 8 Minuten. Jedem Cup wurden 100µl der im Kit enthaltenen Stopplösung hinzugefügt. Der bei dieser Reaktion entstandene Farbumschlag wurde anschließend bei einer Extinktion von 450nm gemessen und die daraus resultierenden Ergebnisse dokumentiert.

3. Ergebnisse

Ein Kollektiv von Seren gesunder Patienten wurde nach Alter in 6 Dekaden eingeteilt. Die Daten der untersuchten Patienten wurden anonymisiert einer Sammlung entnommen und randomisiert anhand des Geburtsdatums geschlechtsunabhängig in die in Tabelle 1.1. beschriebenen Dekaden eingeteilt.

Dekade 1	10 – 20 Jahre
Dekade 2	21 – 30 Jahre
Dekade 3	31 – 40 Jahre
Dekade 4	41 – 50 Jahre
Dekade 5	51 – 60 Jahre
Dekade 6	>61

Tabelle 6: Einteilung der Dekaden

Zu jeder Dekade gehört nach der erfolgten Einteilung nun ein Kollektiv, das pro Dekade eine Stärke von 15 Patientenseren umfasste. Die untersuchte Gesamtkohorte umfasst demnach eine Gesamtstärke von 90 getesteten Seren.

Die Patientenseren der Kollektive wurde in der Folge in Kombination mit den Stämmen der RSV – A und RSV – B Reihe getestet.

3.1 Ergebnisse des Gesamt - ELISA

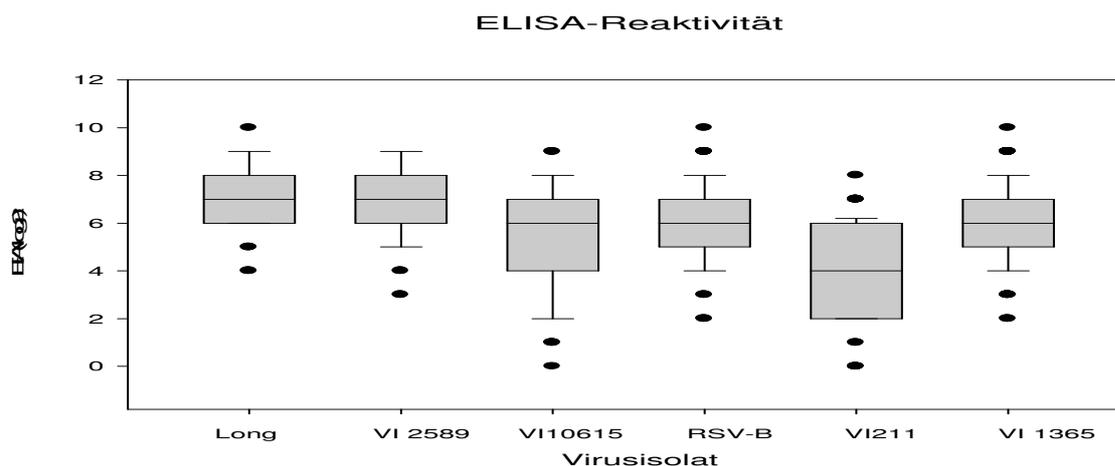


Abb. 8 Testergebnisse aller Seren (n=90) in RSV ELISA, der aus Gesamtlysat von Virusinfizierten Zellen besteht; Long = RSV - A - Laborstamm, VI 2589 und VI 10615 = RSV - A - Wildisolate; RSV - B = Laborstamm, VI 211 und VI 1365 = RSV - B - Wildisolate

Die Gesamtergebnisse der ELISA – Durchführung mit den verwendeten Patientenseren zeigt auf, dass bezüglich der Gesamtantikörpermenge ein Unterschied besteht zwischen RSV A - und verwendeten RSV – B Stämmen. Die RSV A Stämme liegen mit Ausnahme des RSV A Wildtyps 10615 bei mittleren Log – Stufe von 7,0. Der abweichende Wildtyp 10615 liegt im Mittelwert eine Log Stufe unterhalb der ebenfalls getesteten RSV A Stämme, was einer Log Stufe von 6,0 entspricht. Die verwendeten RSV – B Stämme liegen ebenfalls im Mittelwert auf einer Log – Stufe von 6,0. Die Ausnahme bildet hier der RSV – B Wildtyp 211. Dieser verwendete Wildtyp liegt ca. eine Log Stufe unterhalb der anderen verwendetet RSV – B Stämme.

3.1.1 Ergebnis der RSV – A Stämme

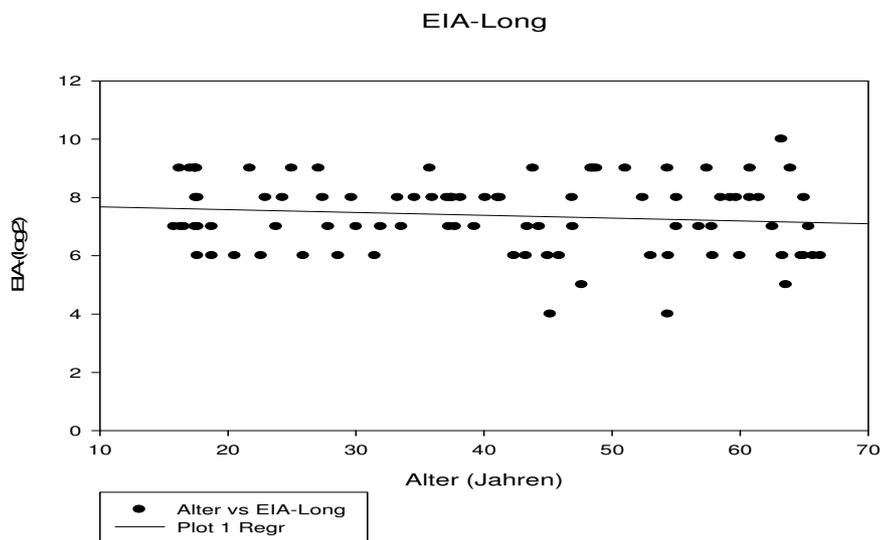


Abb. 9 Veränderung der Reaktivität des RSV A Long-Strain im Verlauf der Dekaden Testung der Seren (n=90) im ELISA, der aus Gesamtlysate von Zellen besteht, die mit dem Laborstamm RSV - Long (RSV-A) infiziert wurden

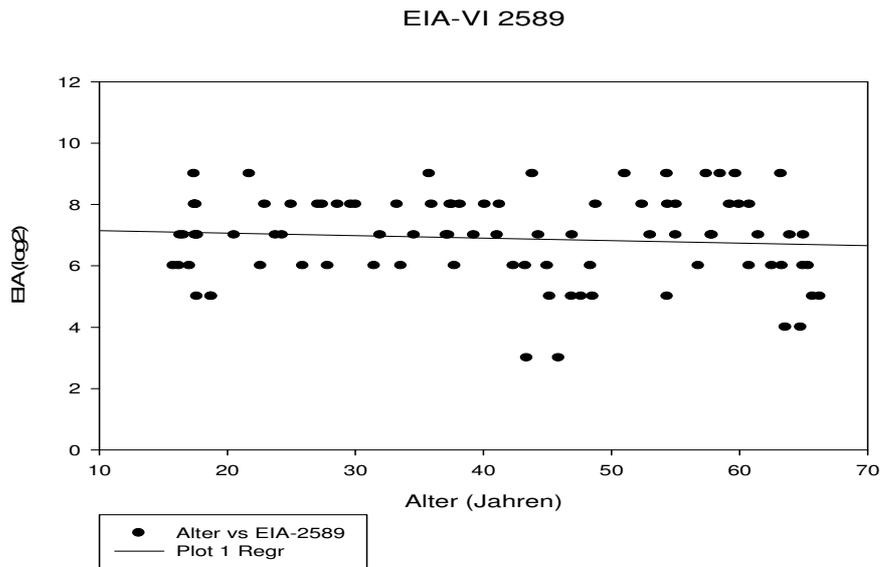


Abb. 10 Veränderung der Reaktivität des RSV 2589 Wildtyp im Verlauf der Dekaden Testung der Seren (n=90) im ELISA, der aus Gesamtllysate von Zellen besteht, die mit dem RSV - A Wildtyp VI 2589 infiziert wurden

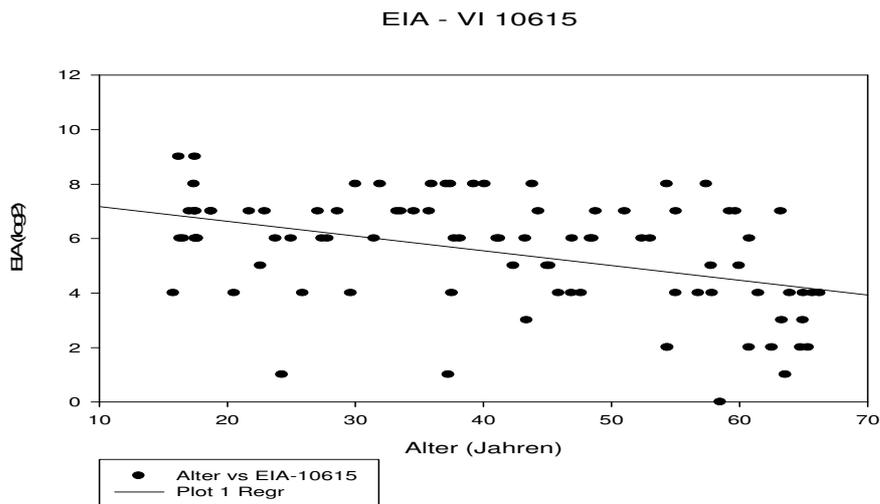


Abb. 11 Veränderung der Reaktivität des RSV 10615 Wildtyp im Verlauf der Dekaden Testung der Seren (n=90) im ELISA, der aus Gesamtllysate von Zellen besteht, die mit dem RSV - A Wildtyp VI 10615 infiziert wurden

Der RSV – A Long-Strain so wie die verwendeten RSV A Wildtypen 2589 und 10615 zeigten eine tendenzielle Abnahme der Konzentration von Antikörpern gegen den getesteten Virusstamm abhängig vom Alter des Patienten auf. Die erhobenen Daten zeigen, dass eine erhöhte Konzentration von Antikörper in der 1. Dekade der unter 20 jährigen besteht, die mit zunehmendem Alter bei RSV – A Long-Strain und RSV A Wildtyp 2589 um eine halbe Log – Stufe abnimmt und somit nur eine geringe Abnahme im Alter aufweist. Dieser Sachverhalt wird ebenfalls durch die

negative Steigung, der Regressionsgeraden die Abb. 10 und Abb. 11 zu entnehmen ist unterstützt. Im Gegensatz zu den beiden zuvor genannten Virusstämmen verhielt sich der getestete RSV A Wildtyp 10615. Dieser wies eine starke Abnahme der Konzentration über den Verlauf der Dekaden auf, dabei konnte ein Senkung der Antikörperkonzentration um 3,5 Log – Stufen festgestellt werden.

3.1.2 Ergebnis der RSV – B Stämme im Gesamt - ELISA

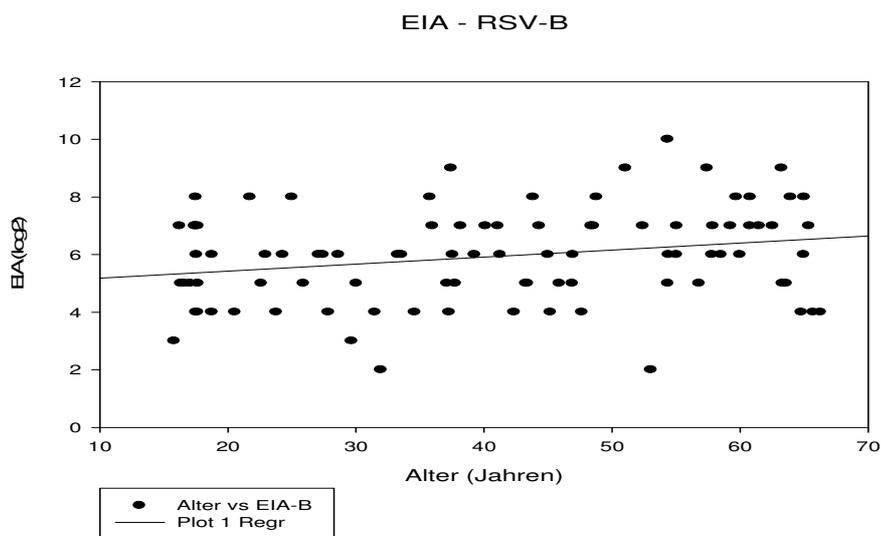


Abb. 12 Veränderung der Reaktivität des RSV B Laborstamm im Verlauf der Dekaden Testung der Seren (n=90) im ELISA, der aus Gesamtlisat von Zellen besteht, die mit dem RSV - B Laborstamm infiziert wurden

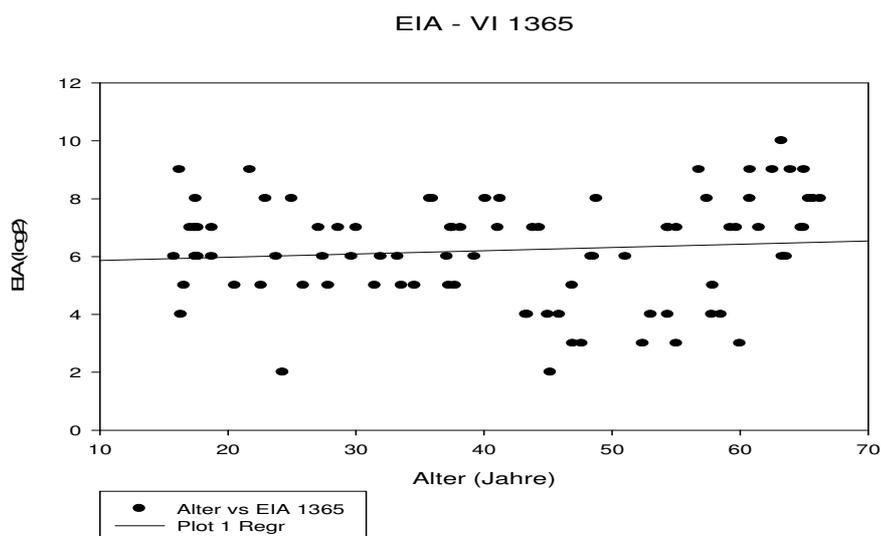
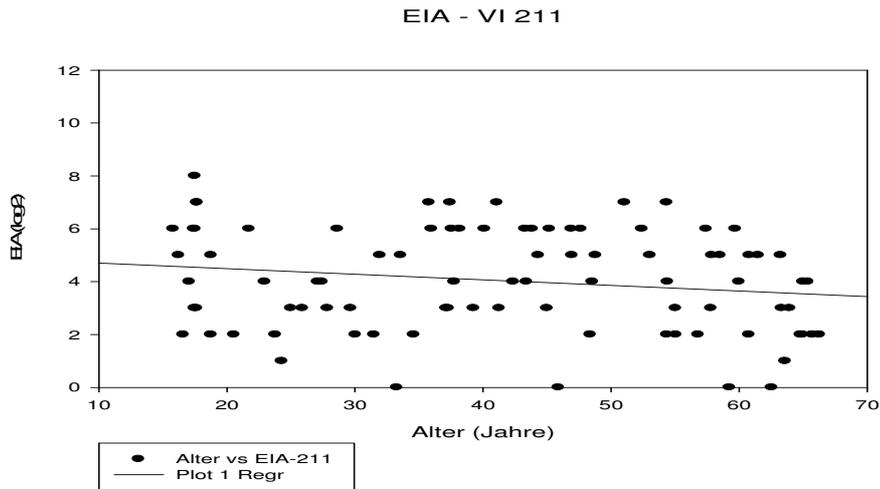


Abb. 13 Veränderung der Reaktivität des RSV 1365 Wildtyp im Verlauf der Dekaden Testung der Seren (n=90) im ELISA, der aus Gesamtlisat von Zellen besteht, die mit dem RSV - B Wildtyp VI 1365 infiziert wurden



**Abb. 14 Veränderung der Reaktivität des RSV 211 Wildtyp im Verlauf der Dekaden
Testung der Seren (n=90) im ELISA, der aus Gesamtlisat von Zellen besteht, die mit dem
RSV - B Wildtyp VI 211 infiziert wurden**

Das Ergebnis des getesteten RSV – B Laborstammes zeigte einen Anstieg der Antikörperkonzentration im Verlauf der Dekaden auf. In der Dekade der unter 20 – jährigen (Dekade 1) wurde eine Log – Stufe von 5,19 festgestellt. Mit zunehmendem Alter der Patienten, deren Serum getestet wurde, kam es zu einem stetigen Anstieg, der sich im Endergebnis in Dekade 6 (Alter ≥ 60) in einer erhöhten Konzentration um 1,5 Log – Stufen widerspiegelte. Die Tendenz des Antikörperanstiegs mit zunehmendem Alter konnte auch bei dem getesteten RSV B – Wildtyp 1365 ausgemacht werden. Bei diesem getesteten Virusstamm liegt eine Differenz von 0,5 Log Stufen zwischen Dekade 1 und Dekade 6 vor. In Abb. 13 verdeutlicht ebenfalls die geringere Steigung der Regressionsgeraden einen stetigen aber geringeren Anstieg der Antikörperkonzentration im Vergleich zum getesteten RSV – B Laborstamm. Ein gegensätzliches Verhalten konnte bei der Testung des RSV – B Wildtyps 211 festgestellt werden. Die nachgewiesene Antikörperkonzentration war im Vergleich der getesteten RSV – B Stämme geringer. Wie aus Abb. 14 ersichtlich, startete die gemessene Gesamtantikörperkonzentration bei einer Log von 4,6. Die abschließende Konzentration in Dekade 6 betrug 3,3 Die ebenfalls negative Steigung der Regressionsgeraden bestätigt die Abnahme der Konzentration der Antikörper gegen RSV 211 im Verlauf der Dekaden.

3.2. Gesamtergebnisse des Neutralisationstestes

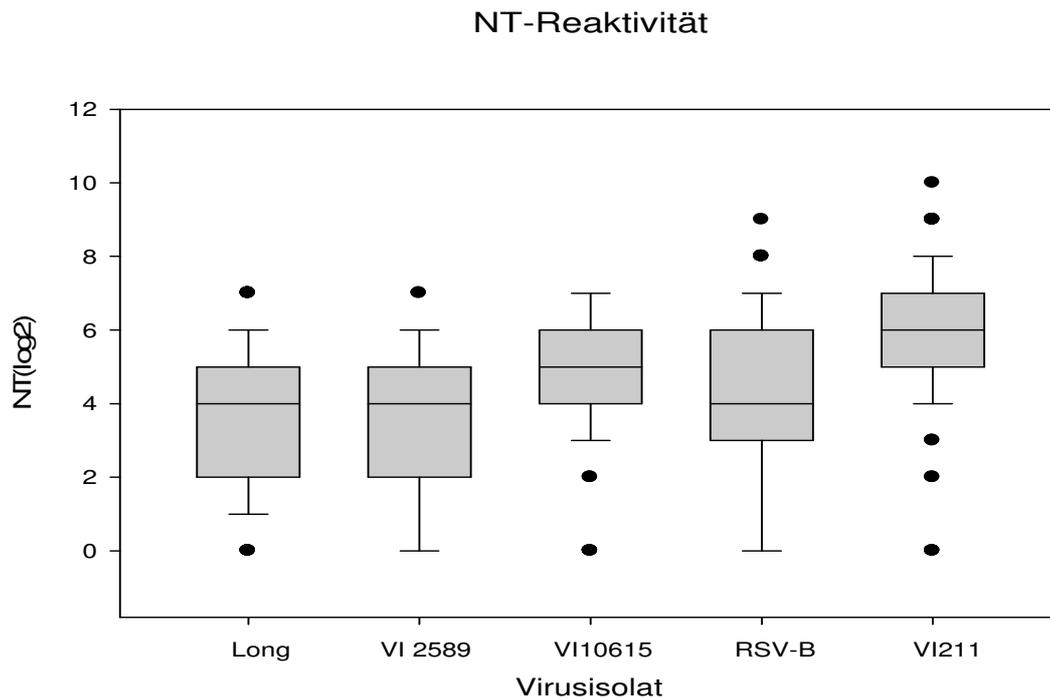


Abb. 15 Veränderung der Gesamtergebnisse des Neutralisationstestes
Testergebnisse aller Seren (n=90) in RSV Neutralisationstest, der mit 5 verschiedenen Virusstämmen durchgeführt wurde; Long = RSV - A - Laborstamm, VI 2589 und VI 10615 = RSV - A - Wildisolate; RSV - B = Laborstamm, VI 211 = RSV - B - Wildisolat

Im Rahmen der Testung der Seren auf neutralisierende Antikörper konnte ein Unterschied zwischen den getesteten RSV – A Stämmen und RSV – B Stämmen nachgewiesen werden. Die RSV – Stämme lagen bei einer durchschnittlichen Log – Stufe von 4, wobei eine Abweichung des getesteten RSV A Wildtyp 10615 um eine Log - Stufe festgestellt wurde. Die Testung der Seren mit dem RSV - B Laborstamm wies ebenfalls eine mittlere Log – Stufe von 4 auf. Die Testung mit dem RSV - B - Virusisolat 211 zeigte im Mittel die höchsten Titer.

3.2.1 Ergebnis Neutralisationstest RSV – A Stämme

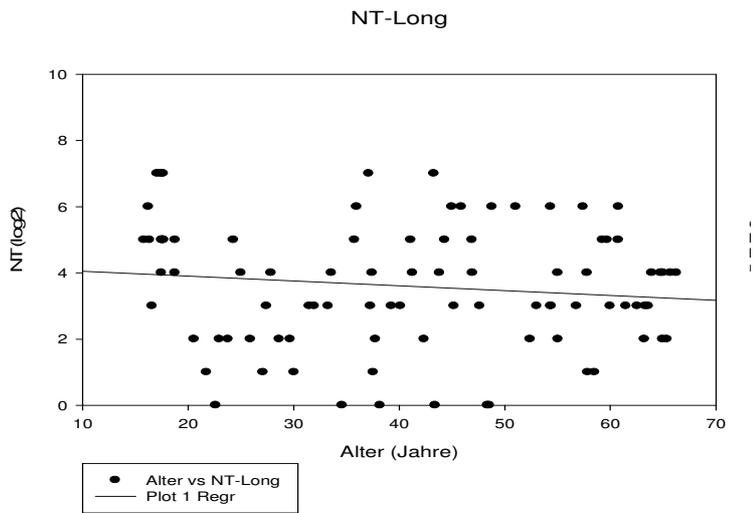


Abb. 16 Testung der Seren (n=90) im Neutralisationstest mit dem Laborstamm RSV-Long (RSV-A)

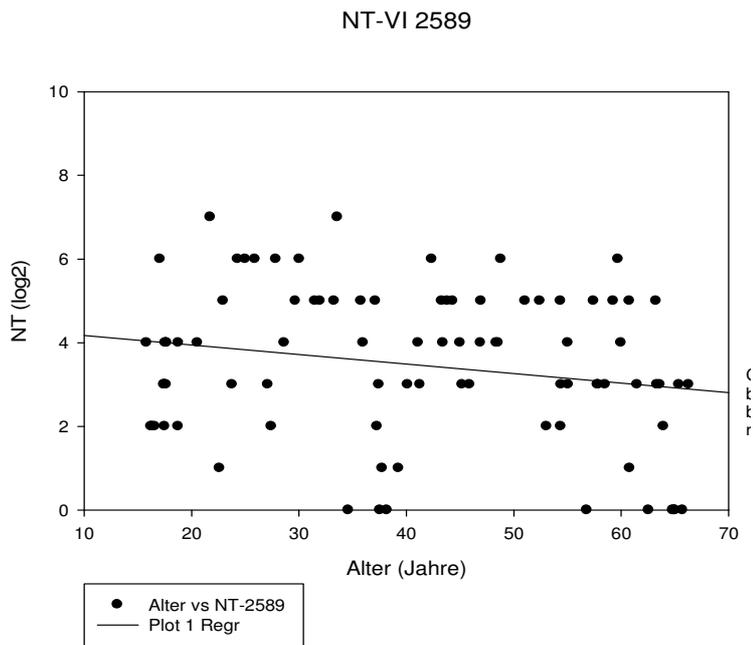


Abb. 17 Testung der Seren (n=90) im Neutralisationstest mit dem Laborstamm RSV - A Wildtyp VI 2589

NT - VI 10615

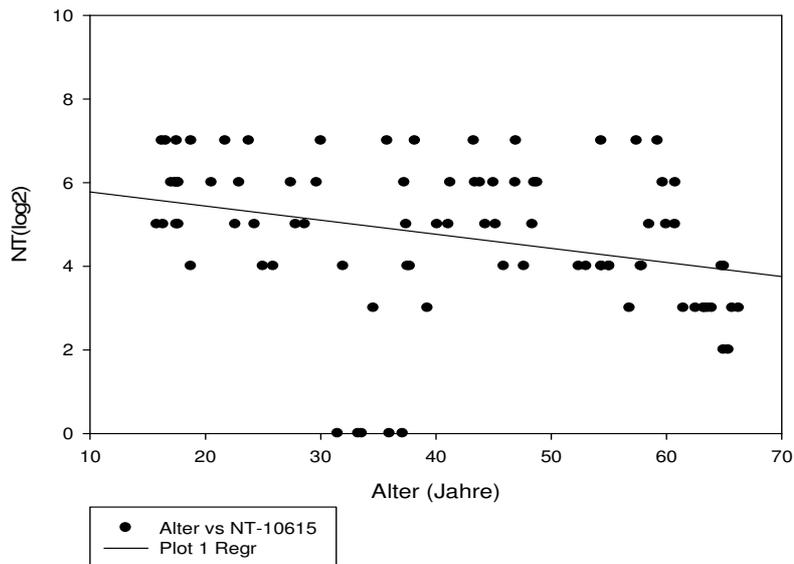


Abb. 18 Testung der Seren (n=90) im Neutralisationstest mit dem Laborstamm RSV - A Wildtyp VI 10615

Nach Auswertung der Neutralisationstests zeigte sich ein Abfall der Konzentration von neutralisierenden Antikörpern über den Verlauf der 6 Dekaden. Der RSV A Long-Strain wies in Dekade 1 eine Log Stufe von 4,1 auf. Im Verlauf der betrachteten Dekaden sank dieser Wert in Dekade 6 auf eine Log – Stufe von 3,2. Das Ergebnis wird durch die negative Steigung der Regressionsgeraden bestätigt. In diesem Zusammenhang zeigte der dem RSV – A Long-Strain nahe verwandte RSV A Wildtyp 2589 ebenfalls ein Absinken der Konzentration an neutralisierenden Antikörpern. Bei Betrachtung über 6 Dekaden hinweg wurde festgestellt, dass es im Verlauf zu einem Absinken der Antikörperzahl um 1,3 Log Stufen (Dekade 1 4,2 auf 2,8 in Dekade 6) kam. Eine Abweichung wies der getestete RSV – A Wildtyp 10615 auf. Hier konnte ebenfalls eine fallende Tendenz der Werte festgestellt werden. Die Gesamtanzahl an neutralisierenden Antikörper belief sich hierbei aber auf höhere Werte als bei den voran getesteten RSV – A Stämmen. In diesem Zusammenhang wies der RSV – A Wildtyp 10615 in Dekade 1 einer Antikörperzahl auf, die einer Log Stufe von 5,7 entsprach. Tendenziell wurde hier ebenfalls ein Abfall festgestellt, der den bereits vorgestellten getesteten RSV – A Typen entsprach. Die in Dekade 6 festgestellten Antikörperzahlen beliefen sich auf eine Log – Stufe von 3,7.

3.2.2 Ergebnis N- Test RSV – B Stämme

Bei der Testung der Seren mit den RSV - B - Stämmen fiel auf, dass relativ viele Seren nicht reaktiv waren. Aus diesem Grund werden diese Ergebnisse im Nachfolgenden in zweifacher Form dargestellt zum einen in Box - Plots sowie in Scatter Plots.

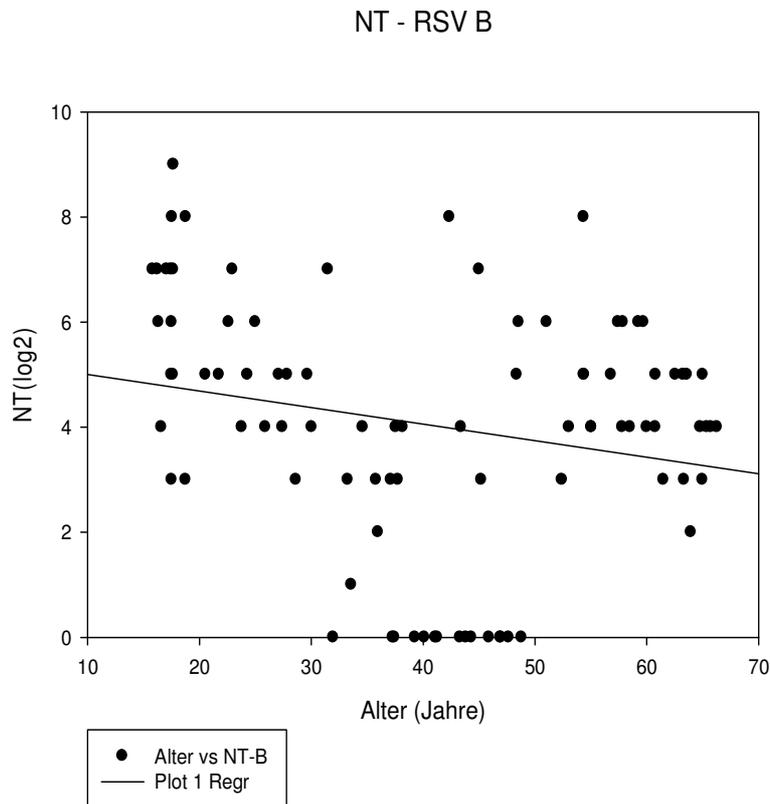


Abb. 19 Testung der Seren (n=90) im Neutralisationstest mit dem Laborstamm RSV - B

NT-RSV-B

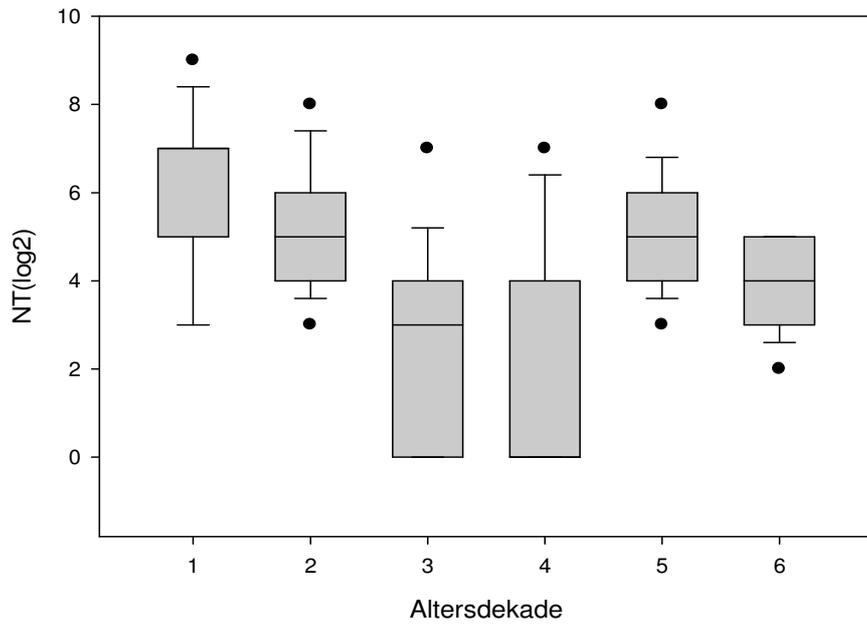


Abb. 20 Testung der Seren (n=90) im Neutralisationstest mit dem Laborstamm RSV - B

NT - VI 211

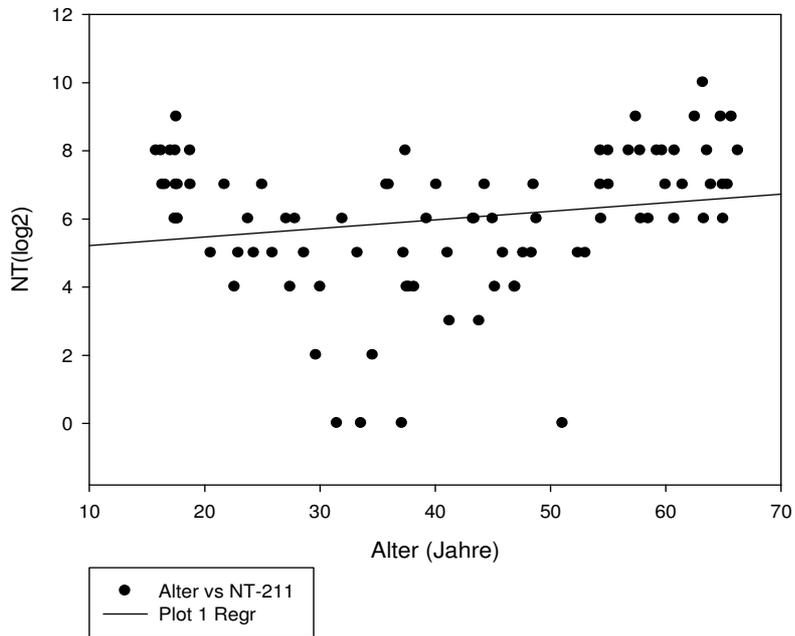


Abb. 21 Testung der Seren (n=90) im Neutralisationstest mit dem Laborstamm RSV - B Wildtyp VI 211

NT-RSV-211

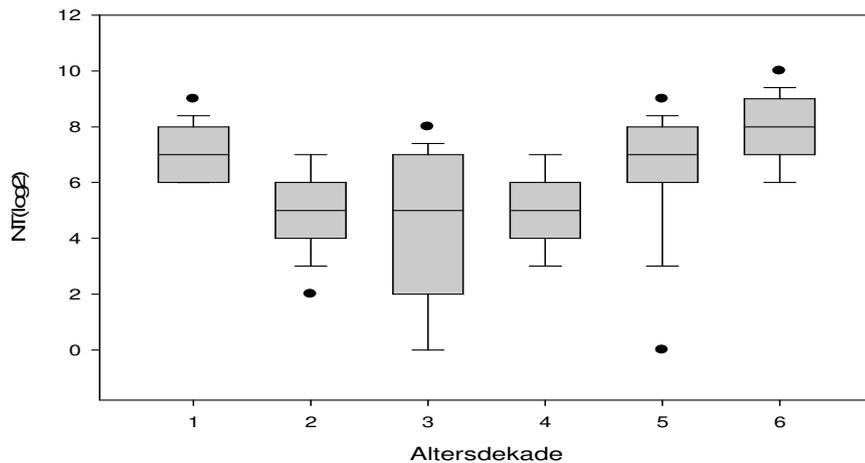


Abb. 22 Testung der Seren (n=90) im Neutralisationstest mit dem Laborstamm RSV - B Wildtyp VI 211

Die verwendeten RSV – B Stämme wiesen in ihrem Verlauf über die 6 Dekaden sowohl innerhalb der Stämme als auch im Vergleich zu den getesteten RSV – A Stämme Unterschiede auf. Der RSV – B Laborstamm zeigte eine fallende Tendenz der neutralisierenden Antikörper über die Altersdekaden der getesteten Patientengruppen, die ebenfalls in den Testergebnissen der RSV –A Stämme vorkam. In Dekade 1, die der Altersgruppe der unter 20 -Jährigen entsprach, konnte Antikörperkonzentration einer Log – Stufe von 5,0 festgestellt werden. Der Endpunkt des Abfalls in Dekade 6 konnte bei Log – Stufe 3,1. Die Betrachtung der Ergebnisse wie in Abb. 19 geschehen, zeigte eine weitere Veränderung über den Verlauf der Dekaden auf. Die Entwicklung über die Dekaden hinweg präsentierte hierbei den RSV – B Laborstamm mit einer zunächst fallenden Tendenz der Konzentrationen über die Dekaden 1 und 2 hinweg. In den Dekaden 3 und 4, die einem Alterskollektiv von 30 – 39 (Dekade 3) und 40 – 49 (Dekade 4) entsprachen, wurde ein niedriges Plateau erreicht, das seinen Mittelwert bei einer Log – Stufe von 3,06 aufweist. Es zeigte sich weiteren Verlauf, dass es zu einem Wiederanstieg der Antikörperkonzentrationen im weiteren Verlauf der Dekaden kam. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls zu erwähnen, dass es in Dekade 6 abermals zu einem Abfall der Konzentration kam, der Mittelwert in Dekade 6 aber weiterhin einen um eine 1 Log – Stufe höheren Antikörperkonzentration entsprach, als das zuvor in Dekade 2 und 3 erreichte niedrige Plateau. Der Verlauf der Konzentrationen im getesteten RSV – B Wildtyp VI 211 zeigte andere Tendenzen auf, als der zuvor gestestete RSV – B Laborstamm. Ausgehend von einer Log – Stufe von 5,1 stieg die

Konzentration der neutralisierenden Antikörper im Verlauf der Dekaden im Gegensatz zu allen zuvor getesteten Virusisolaten an. Der Endpunkt in Dekade 6 lag bei einer Log Stufe von 6,7. Der positive Anstieg der Regressionsgerade ist in Abb. 21 zu sehen, und bestätigt ebenfalls dieses Ergebnis. Durch eine veränderte Darstellung der Ergebnisse, Abb. 20 mittels Boxplots konnte ein weiterer Unterschied zu den getesteten RSV A – Stämmen aufgezeigt werden. Die Durchführung des Neutralisationstestes mit dem im Gesamt – ELISA eingeschlossenen RSV – B Wildtyp VI 1365 konnte nicht durchgeführt, werden, da eine Anzuchtung des Virus und damit eine TCDI - 50 Bestimmung des Inokulats sich als problematisch und nach mehreren Versuchen als nicht durchführbar erwies.

Wie schon der RSV – B Laborstamm, weist der RSV – B Wildtyp VI211 eine zunächst sinkende Tendenz der Konzentration an neutralisierenden Antikörper auf. Ausgehend von einem Niveau im Mittelwert von Log – Stufe 6,8 in Dekade 1 sinken die Werte in den Dekade 2 – 4 auf eine Log – Stufe die ihren Tiefpunkt bei 5,0 aufweist. Die Plateauphase der Dekaden 2 – 4 die Abb. 22 aufzeigt, wurde in den Seren der getesteten Dekaden 5 und 6 durch einen stetigen Anstieg zunächst auf eine im Mittelwert liegende Log – Stufe von 6,97 in Dekade 5 und abschließend in Dekade auf eine Log Stufe von 7,99 abgelöst

3.3 Ergebnis N – und F - ELISA

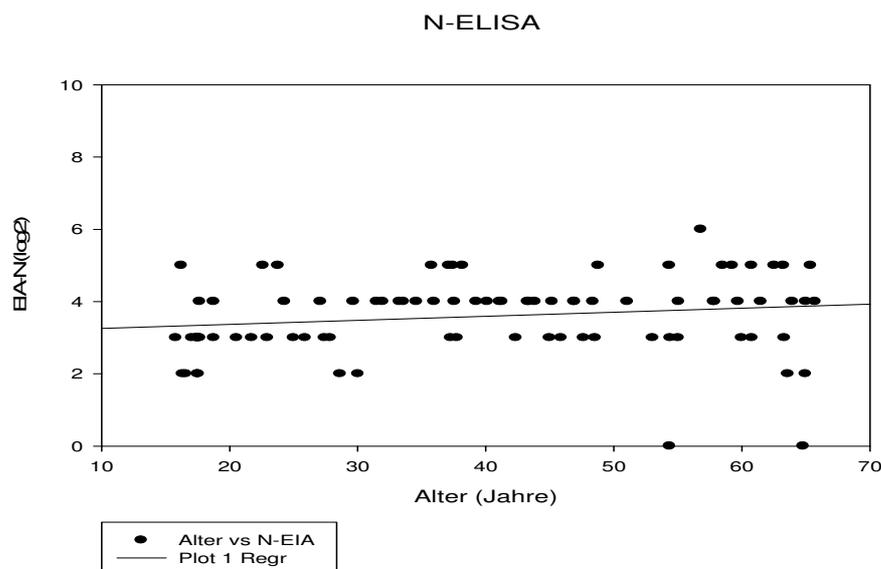


Abb. 23 Gesamtergebnis des N – Protein ELISA über den Verlauf der Dekaden

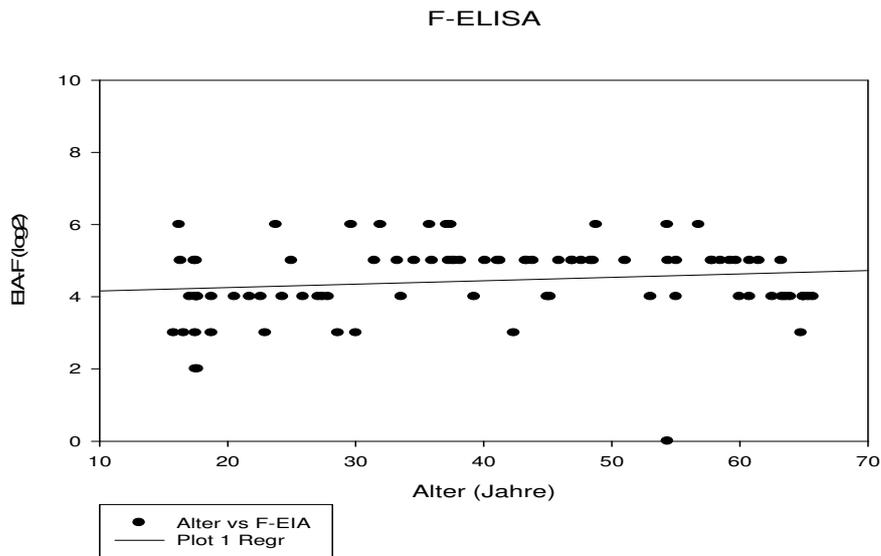


Abb. 24 Gesamtergebnis des N – Protein ELISA über den Verlauf der Dekaden

Die Seren des getesteten Kollektivs wurden weiterhin auf das Vorhandensein von RSV - F und RSV – N Antikörpern hin untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Konzentration von der RSV – F Antikörper im Verlauf der Dekaden einem Anstieg unterworfen ist. In Dekade 1 konnte eine Antikörperkonzentration Log – Stufe von 4,1 nachgewiesen werden. Abb. 23 ist anhand der Steigung der Regressionsgerade zu entnehmen, dass ein Anstieg der Konzentration der Antikörper mit zunehmenden Alter erfolgt. Der Anstieg mündet in einer Konzentration einer Log – Stufe von 4,6 und lag somit bei 0,5 Log – Stufen. Äquivalent zur Testung des RSV – F Proteins wurde die Konzentration der Antikörper gegen das RSV – N Protein gemessen. Es konnte im Verlauf dieser Testung ebenfalls ein Anstieg der Konzentrationen der spezifischen Antikörper altersabhängig festgestellt werden. Ausgehend von einer Konzentration von einer Log – Stufe von 3,2 kommt es zu einem Anstieg im Verlauf auf einen Wert einer Log – Stufe von 3,9 in Dekade 6. In Abb. 24 wird dieser Trend durch die Steigung der Regressionsgerade beschrieben.

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die Veränderungen der Antikörper – Titer gegen das RS –Virus in einem Kollektiv, das 6 Altersdekaden umfasst untersucht. Als Nachweismethode wurde ein ELISA sowie ein Neutralisationstest verwendet, die beide die Detektion spezifischer Antikörper ermöglichen.

Der Neutralisationstest gilt unter den beiden gewählten Verfahren als Goldstandard und ist gegenüber dem ELISA als spezifischer anzusehen. Andererseits ist die Durchführung des Neutralisationstests gegenüber dem ELISA mit einem erheblich größeren Zeitaufwand verbunden und setzt ein Labor mit einer etablierten Zellkulturtechnik sowie ein Virus voraus, dass in der Zellkultur replikationsfähig ist.

4.1 Diskussion Ergebnisse der RSV A Stämme

Die Ergebnisse, die in dieser Dissertation erhoben wurden, zeigen auf, dass es Abweichungen in der Höhe der Antikörpertiter sowohl zwischen den verwendeten RSV – A Stämmen und B – Stämmen als auch innerhalb der verwendeten Stämmen gibt. Die RSV – A Stämme zeigen eine kontinuierliche Abnahme der Antikörper im Verlauf der Generationen. Das RS – Virus unterliegt in seiner Gesamtheit und damit Vorkommen in der Bevölkerung einem saisonalen Verlauf und damit verbundener Häufung. Ein ähnliches saisonales Verhalten, ist vom Influenza Virus bekannt, dessen Vorkommen ebenfalls eine saisonale Zunahme regelmäßig während der kalten Jahreszeit aufweist. Es ist beim RS- Virus festzustellen, dass beide RSV Subtypen in jedem Jahr vorkommen, aber eine unterschiedliche Prävalenz aufweisen. Die mit steigendem Alter der Generation aufkommenden niedrigeren Antikörpertiter basieren möglicherweise auf einer generellen Abnahme der Aktivität des Immunsystems im Alter (Linton, P. J. & Dorshkind, K. 2004). Bei Betrachtung der äquivalenten Seren der 1 Dekade der 10-20 jährigen kann man den Rückschluss ziehen, dass in den letzten Jahren eine niedrigere Infektionsrate mit den RSV A Stämmen zwar vorherrschte, insgesamt aber eine, wenn auch geringe, Abnahme dieser Infektionsrate zustande kam. Eine Möglichkeit dieses Phänomen zu erklären basiert auf der Annahme, dass es in den letzten 40 Jahren zu einem Wechsel im Erregerspektrum kam und somit das RS – Virus des A – Stammes in einem geringeren Maße im Umlauf innerhalb der Bevölkerung war. Basierend auf dieser Annahme wäre die Differenz der Antikörper – Titer durch eine geringere

Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem RS – Virus des Typ A und seiner Wildtypen zu erklären. Die Grundlage einer adäquaten und hohen Antikörperantwort würde auf einer regelmäßigen Auseinandersetzung mit dem RSV – A basieren, die hierbei nicht gegeben wäre, und somit könnte dieser Sachverhalt eine Abnahme der Antikörpertiter im Verlauf der Generationen erklären. Die hohen Antikörperzahlen in der 1. Generation könnten auf der Grundlage basieren, dass wir in den letzten 10 Jahren wieder ein vermehrtes Aufkommen der RS – Viren des A – Typs haben, da eine adäquate Immunität auf Grund der geringeren Antikörpertiter gegen das Virus nicht gegeben, und somit die Kinder keinen Kontakt mit dem Virus hatten. Ein weiteres Phänomen, das die kontinuierliche Abnahme erklären könnte, ist die stetige Abnahme der Effektivität des Immunsystems im Verlauf des Alterungsprozesses des Menschen. Die schwerwiegenden Erkrankungen mit teilweise tödlichem Ausgang, die das RS – Virus in älteren Personen hervorruft (2. Platz hinter Influenza) (Drinka, P. J., Gravenstein, S., Krause, P., Langer, E. H., Barthels, L., Dissing, M. et al. 1999), könnten auf dieser Grundlage basieren. Gegenstand der Diskussion ist, ob das Virus selbst für die Schwere der Erkrankung verantwortlich ist, oder die Antwort des Immunsystems die Schwere der Erkrankung bestimmt. Die Tendenz geht in die Richtung, dass das RS – Virus selbst für die Schwere der Infektion verantwortlich ist, da gezeigt werden konnte, dass auch in immunsupprimierten Patienten, zum Beispiel Patienten mit Zustand nach Organtransplantation, eine schwere Erkrankung mit RSV auftreten kann (Couch, R. B., Englund, J. A., & Whimbey, E. 1997). Unsere Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bei stetiger Abnahme der Antikörperkonzentration mit zunehmendem Alter angenommen werden kann, dass das Virus selbst die Schwere der Erkrankung bestimmt und somit diese Annahme bestätigt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der RSV B Stämme

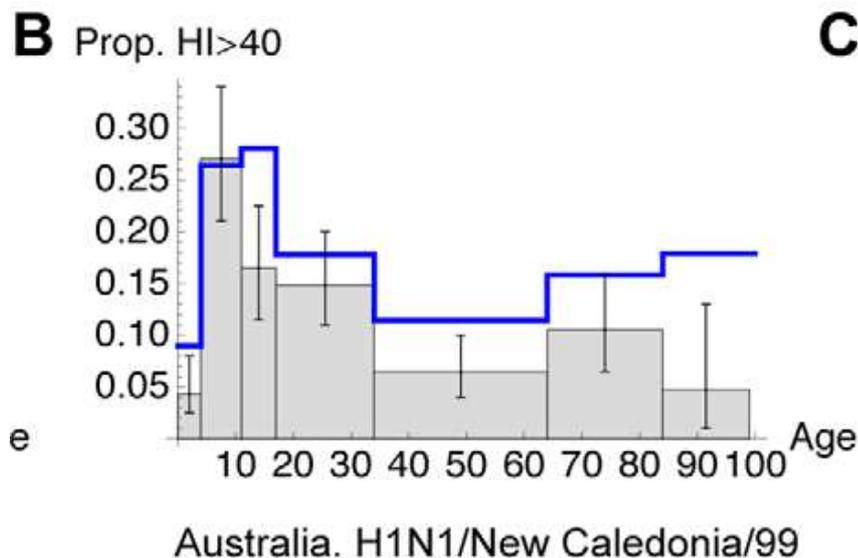
Im Rahmen der Testung der RSV – B Stämme wurde eine steigende Tendenz der Antikörpertiter im Verlauf der Generationen bei RSV B und RSV 1365 festgestellt. Im Gegensatz hierzu zeigte der getestete RSV B Wildtyp 211 eine Abnahme der Gesamtantikörpertiter im Verlauf. Die Ergebnisse des Neutralisationstestes zeigten zunächst einen Antikörper- Peak in der ersten Generation der 10 – 20 Jährigen. In den folgenden Generationen konnte eine Abnahme der Antikörpertiter festgestellt

werden, die sich in der 2. und 3. Generation manifestierte. Auf dieses Tal folgte ein erneuter Anstieg in den Generationen der über 40 jährigen, deren Trend sich bis zur letzten getesteten Generation fortsetzte.

4.3 Erklärungsansätze für das unterschiedliche Verhalten der RSV-A und RSV-B-Stämme

Für das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen RSV-Typen haben wir folgende Erklärungsansätze:

1. Das Phänomen der Talsohle im Bereich der jungen Erwachsenen, das wir beobachtet haben in den Dekaden 2 und 3 (20- 30 und 30 – 40) ist ein auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesenes Phänomen. Kucharski, und Gog konnten beim Influenza Virus A mit ihrem mathematischen Modell, das multiple Influenza Stränge umfasste, aufzeigen, dass auch hier das Phänomen der Talsohle zu beobachten ist. Es zeigten sich hohe Antikörper -Titer gegen das Haemagglutinin in den Seren heranwachsender Testpersonen gefolgt von einem klaren Einbruch der Seropositivität zwischen jungem Erwachsenen und sechzigstem Lebensjahr gefolgt von einem anschließenden Wiederanstieg. (Kucharski, A. J. & Gog, J. R. 2012)



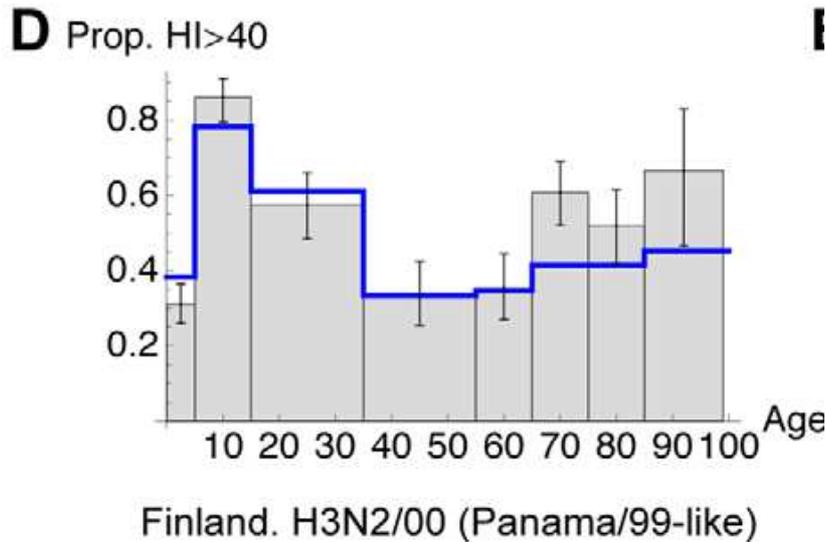


Abb. 25 Vergleich mathematischer Modelle basierend auf Daten aus Australien und Finnland . Die grauen Balken zeigen die durchschnittliche Höhe der serumpositiven Proben in jeder Kohorte mit zweifachen Konfidenzintervall . Die blauen Linien zeigen das am besten passende mathematische Modell. (Kucharski, A. J. & Gog, J. R. 2012)

In diesem Zusammenhang stellen sie die Theorie auf, das dieses Phänomen auch durch die so genannte „*first Antigen Sin*“ zu erklären ist.

Diese Hypothese ist eine Möglichkeit, die unsere Testergebnisse - in diesem Fall den Antikörperanstieg in den höheren Altersgruppen gegenüber den RSV - B erklären könnte. Es handelt sich hierbei um eine bereits stattgehabte Auseinandersetzung mit dem jeweiligen Virus, in diesem Fall mit den RSV B Stämmen. Das Phänomen der sog. „*First Antigen Sin*“ wurde zuerst von Thomas Francis im Jahre 1960 postuliert. Es besagt, das die ersten Antikörper gegen einen Erreger, die meist bereits in der Kindheit produziert werden, lebenslang die dominierenden Antikörper sind und dies auch bei späteren Infektionen mit verwandten Antigenen, in diesem Fall anderen Virus Subtypen, bleiben. Das Immunsystem des Individuums hat bereits in früheren Lebensjahren eine Infektion mit dem Virus durchgemacht und im Rahmen dieser Infektion Antikörper und Gedächtniszellen gebildet. Eine in späteren Jahren folgende Infektion mit einem ähnlichen Virus hat als Resultat eine ineffektive Immunantwort zur Folge. In Bezug auf das RS – Virus kann diese Hypothese die vorliegenden Ergebnisse stützen. Eine frühere Infektion mit dem RSV – B Virus und seinen Wildtypen könnte die steigenden Antikörpertiter in den älteren Generationen erklären. Die älteren Mitbürger haben eine Infektion mit dem RSV – B Virus und seinen Subtypen durchgemacht. Wenn aktuell eine Infektion mit RSV A und seine Wildtypen in der Gesellschaft kursiert (siehe Abb. 9, Abb.10, Abb.11), bildet die

ältere Generation verstärkt Antikörper gegen das ihrem Immunsystem bereits bekannt RSV – B. Diese Immunantwort ist ineffektiv und es kommt somit zu teilweise schweren Infektionen. (Lambert, P. H., Liu, M., & Siegrist, C. A. 2005)
Dieses Phänomen zeigte sich deutlich innerhalb des getesteten Wildtyps RSV 211 und in geringerem Umfang bei RSV – B nach der Auswertung des Neutralisationstestes.

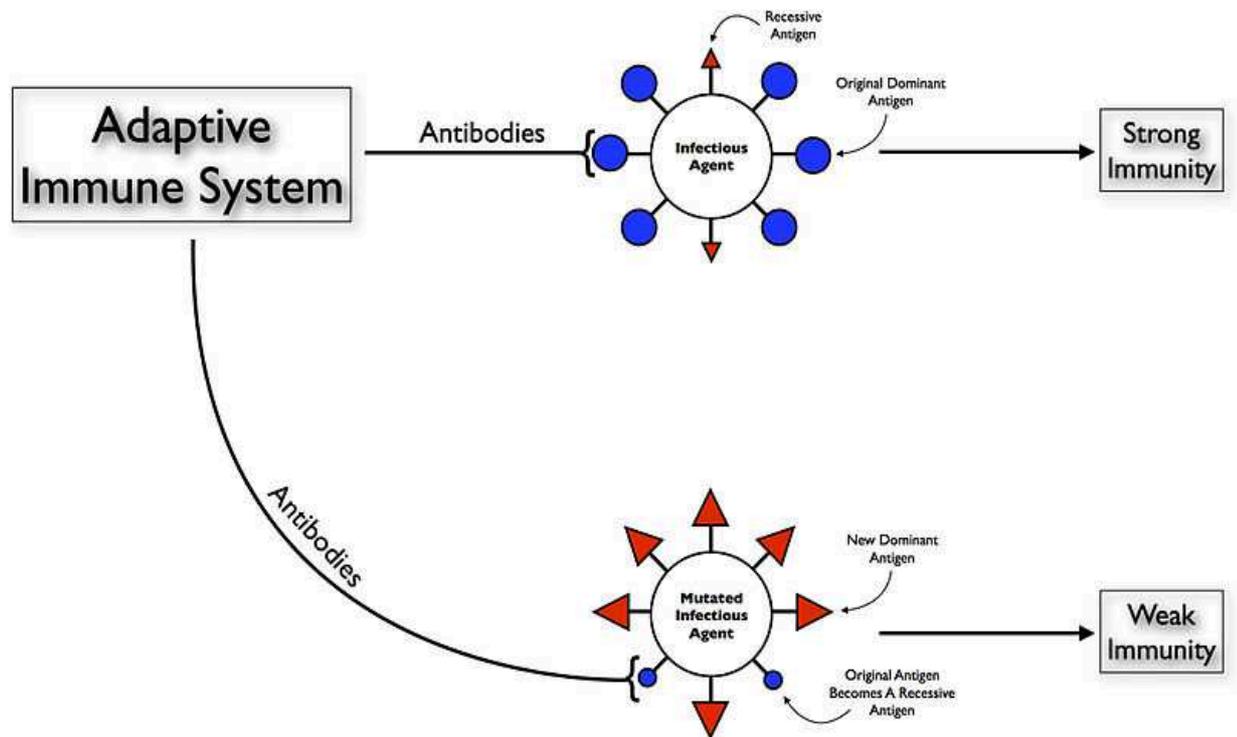


Abb. 26 Der Körper produziert beim ersten Kontakt passende effektive Antikörper gegen das dominante Epitop und kann somit das Virus eliminieren. Kommt es im Verlauf des Lebens zu einer Infektion mit einem ähnlichen Virus, das aber zusätzlich ein neues dominantes Antigen aufweist, produziert der Körper gegen das nun rezessive Antigen Antikörper und es kommt nur zu einer ineffektiven Immunantwort. (Sabban, S., Ye, H., & Helm, B. 2013)

2. Ein anderer Erklärungsansatz beruht nicht auf der Theorie des first antigenic sin: Grundlage dieser Erklärung ist eine zu vermutende geringere Exposition der 20-40 Jährigen gegenüber dem RSV durch eine in unserer Gesellschaft zu beobachtende Verschiebung der Lebensphasen vor allem bezüglich der Familiengründung. Die in dieser Dissertation erhobenen Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass eine Virusübertragung von Kindern und Jugendlichen auf ihre Eltern und Großeltern statistisch später erfolgt und damit diesen Einbruch der Antikörperzahlen erklären

könnte. Es ist allgemein anerkannt, dass nahezu 50 -70% der Kinder im Alter von 1 Jahr und nahezu alle Kinder bis zum 2. Lebensjahr in Kontakt mit dem Erreger gestanden haben und somit Antikörper gegen das RS – Virus aufweisen. (RKI). Diese Statistik stützt die Annahme, dass bei einem Kontakt mit infizierten Kindern eine Reinfektion der adulten Bezugspersonen, in diesem Fall der Eltern oder Großeltern, möglich ist und somit ein Anstieg der Antikörpertiter zu erklären ist. In diesem Zusammenhang könnte ein Schnupfen oder Symptome eines leichten grippalen Infekts eine Infektion mit dem RS – Virus sein, die aber auf Grund der Symptomatik nicht als solche erkannt wird, da die spezifische Testung nicht durchgeführt wurde. Eine Datenerhebung des statistischen Bundesamtes, in der verfolgt wurde, wann Frauen ihre Kinder bekommen, zeigte auf, dass die 30 – 34 jährigen - dies entspricht in der vorliegenden Arbeit der 3 Dekade - die höchsten Geburtenraten aufwiesen. Die Mütter und Väter kommen in diesem Zusammenhang nach der Geburt ihres Kindes mit dem RS –Virus in Kontakt und bilden somit Antikörper, die einen Anstieg im weiteren Verlauf der Generationen erklären. Die Geburtenrate in den ersten beiden Generationen fällt basierend auf den Daten geringer aus und spricht dafür, dass in den Generationen 1 und 2 eine geringere Exposition mit dem RS – Virus vorliegt und damit ein Abfall der Anzahl an Antikörpern erklärt werden kann. Als Ausblick in die Zukunft ist es möglich anzunehmen, dass wir dieses bei RSV – B Stämmen beobachtete Phänomen der Antikörperabnahme in den mittelaltrigen Segmenten, bei gleichzeitiger Zunahme im Rahmen der älteren Generationen, bei weiterer Beobachtung auch bei RSV - A Stämmen wieder finden würden, da es den Anschein hat, dass wieder ein vermehrtes Aufkommen von Erregern des RSV – A Typs zur Zeit zu beobachten ist, was die hohen Titer der 1. Generation in Bezug auf RSV – A und dessen Wildtypen vermuten lassen. Abschließend könnte man vermuten, dass dieses Phänomen aber auch bereits bei RSV A Stämmen eingetreten ist und wahrscheinlich bei Testung weiterer Stämme schon heute beobachtet werden könnte oder in Zukunft auftreten wird. Die Bestätigung dieser Vermutung benötigt aber zukünftige Studien.

4.4 Diskussionen der Ergebnisse des N- und F – ELISA

Die Untersuchung der getesteten Patientenseren im Rahmen dieser Dissertation wiesen einen Anstieg der Antikörper gegen das N – und das F-Protein auf. Zum Nachweis der spezifischen Antikörpern wurde ein kommerziell verfügbare Test – Kit

verwendet, dessen Proteine auf dem RSV – A Long - Strain basieren. Die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse beweisen einen Anstieg der Antikörper gegen die spezifischen Proteine, lassen aber nur bedingt eine Korrelation zwischen Gesamtantikörper und den nachgewiesenen Proteinen zu. Die Ergebnisse verdeutlichen nahezu konstant hohe Antikörper gegen das Fusionsprotein des RS – Virus. Ein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Generationen besteht aber nicht. Dieses Ergebnis kann durch die hohe Gesamtantikörperzahl gegen RSV – A erklärt werden, die in allen getesteten Generationen vorhanden waren. Dieser Sachverhalt erklärt in diesem Zusammenhang die hohen Titer an Antikörpern gegen das Fusionsprotein. Ein Rückschluss von Titern der Antikörper gegen das Fusionsprotein auf die Gesamtantikörperzahl ist nicht möglich. Grund hierfür ist die Testung der Antikörper über eine Gesamtzahl von 4 Log – Stufen. Viele Testergebnisse sind in einen Bereich, wo eine Differenzierung nicht möglich ist, da die Abstufungen fehlen. Der Nachteil dieser Testung ist, dass Unterschiede der F – Proteine von RSV – A Stämmen und RSV – B bestehen und somit eine Testung der relevanten RSV – B Stämme unterbleibt. Dieser Sachverhalt gilt ebenfalls für die getesteten N – Protein Antikörper. Abschließend kann man basierend auf den in dieser Dissertation erhobenen Ergebnisse sagen, dass eine Testung auf N – Protein und F – Protein zwar den Kontakt mit dem RS –Virus nachweisen, aber keinen Rückschluss auf Gesamtantikörper und neutralisierende Antikörper zulassen und somit keine prognostische Einschätzung des Infektionsrisikos erlauben.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, experimentell die Fragestellung zu beantworten, ob bezüglich der humoralen Immunantwort gegen das Respiratory Syncytial Virus (RSV) eine Korrelation zwischen dem Lebensalter und der spezifischen Antikörperkonzentration zu finden ist. Dazu wurden Seren aus verschiedenen Lebensdekade sowohl in einem ELISA-Verfahren wie auch in dem als hochspezifisch geltenden Neutralisationstest gemessen. Um der Typenvielfalt des RSV gerecht zu werden, wurden diese Tests mit sechs verschiedenen RSV-Wildisolaten (3 RSV A und 3 RSV B) durchgeführt.

Als wichtige Ergebnisse zeigten sich zum einen Unterschiede zwischen ELISA und NT: Während der ELISA bis auf eine Ausnahme nur geringe Fluktuation der Antikörperaktivitäten mit den verschiedenen Typen zeigte, fanden wir im Neutralisationstest deutliche Tendenzen der Antikörpertiter abhängig vom Lebensalter. Interessanterweise fanden sich dabei aber unterschiedliche Verläufe in Abhängigkeit vom verwendeten Subtyp. Zwei RSV-B-Stämme zeigten in den höheren Lebensdekaden einen Wiederanstieg der Antikörpertiter nach einem Abfall bei den 20-40 Jährigen. Als Erklärungsansatz dafür in der vorliegenden Arbeit zum einen das Phänomen der "first antigenic sin" herangezogen, das der erste Kontakt im Leben mit einem bestimmten Subtyp die Immunantwort lebenslang dominiert, eine effektive Immunantwort auf neue Virustypen ausbleibt und erst mit großem zeitlichen Abstand und veränderten Virusantigeneigenschaften eine effektive Antwort zulässt. Als anderen Erklärungsansatz werden epidemiologische Phänomene herangezogen, die auf unterschiedliche Expositionshäufigkeiten durch veränderte Lebensplanungen beruhen und damit zu geringeren RSV-Kontakten der 20-40 Jährigen führen. Dass die beobachteten Phänomene bei zwei RSV-B gesehen wurden, lässt keinen Rückschluss auf grundsätzliche Eigenschaften der RSV-A und RSV-B Typen zu, sondern könnte auch zufällig sein.

Die Ergebnisse der Arbeit sind wichtig für die Interpretation vieler Studien der Vergangenheit wie der Gegenwart. Die bei Studien zu RSV-Neutralisationstesten verwendeten Laborstämme sind meist Jahrzehnte alt und spiegeln nicht den Schutz vor aktuell zirkulierenden Stämmen wieder. Ein standardisierter RSV-Neutralisationstest erscheint damit nicht möglich. Die oben beschriebenen Veränderungen der Antikörperkonzentrationen mit steigendem Lebensalter könnten einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Manifestationsraten in den verschiedenen Altersgruppen liefern.

REFERENCES

- Ali-Ahmad, D., Bonville, C. A., Rosenberg, H. F., & Domachowske, J. B. 2003. Replication of respiratory syncytial virus is inhibited in target cells generating nitric oxide in situ. *Front Biosci.*, 8: a48-a53.
- Allander, T., Jartti, T., Gupta, S., Niesters, H. G., Lehtinen, P., Osterback, R., Vuorinen, T., Waris, M., Bjerker, A., Tiveljung-Lindell, A., van den Hoogen, B. G., Hyypia, T., & Ruuskanen, O. 2007. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin.Infect.Dis.*, 44(7): 904-910.
- Asenjo, A., Mendieta, J., Gomez-Puertas, P., & Villanueva, N. 2008. Residues in human respiratory syncytial virus P protein that are essential for its activity on RNA viral synthesis. *Virus Res.*, 132(1-2): 160-173.
- Becker, S., Quay, J., & Soukup, J. 1991. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J.Immunol.*, 147(12): 4307-4312.
- Bennett, B. L., Garofalo, R. P., Cron, S. G., Hosakote, Y. M., Atmar, R. L., Macias, C. G., & Piedra, P. A. 2007. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J.Infect.Dis.*, 195(10): 1532-1540.
- Blondot, M. L., Dubosclard, V., Fix, J., Lassoued, S., Aumont-Nicaise, M., Bontems, F., Eleouet, J. F., & Sizun, C. 2012. Structure and Functional Analysis of the RNA- and Viral Phosphoprotein-Binding Domain of Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein. *PLoS.Pathog.*, 8(5): e1002734.
- Blount, R. E., Jr., MORRIS, J. A., & SAVAGE, R. E. 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 92(3): 544-549.
- Boyton, R. J. & Openshaw, P. J. 2002. Pulmonary defences to acute respiratory infection. *Br.Med.Bull.*, 61: 1-12.
- Braciale, T. J. 2005. Respiratory syncytial virus and T cells: interplay between the virus and the host adaptive immune system. *Proc.Am.Thorac.Soc.*, 2(2): 141-146.
- Bueno, S. M., Gonzalez, P. A., Cautivo, K. M., Mora, J. E., Leiva, E. D., Tobar, H. E., Fennelly, G. J., Eugenin, E. A., Jacobs, W. R., Jr., Riedel, C. A., & Kalergis, A. M. 2008. Protective T cell immunity against respiratory syncytial virus is efficiently induced by recombinant BCG. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 105(52): 20822-20827.
- Chanock, R. M., Kim, H. W., Vargosko, A. J., DELEVA, A., JOHNSON, K. M., CUMMING, C., & Parrott, R. H. 1961. Respiratory syncytial virus. I. Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory diseases in children. *JAMA*, 176: 647-653.
- Collins, P. L. & Graham, B. S. 2008. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J.Virol.*, 82(5): 2040-2055.

- Collins, P. L. & Mottet, G. 1991. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J.Gen.Virol.*, 72 (Pt 12): 3095-3101.
- Couch, R. B., Englund, J. A., & Whimbey, E. 1997. Respiratory viral infections in immunocompetent and immunocompromised persons. *Am.J.Med.*, 102(3A): 2-9.
- Culley, F. J., Pollott, J., & Openshaw, P. J. 2002. Age at first viral infection determines the pattern of T cell-mediated disease during reinfection in adulthood. *J.Exp.Med.*, 196(10): 1381-1386.
- Culley, F. J., Pollott, J., & Openshaw, P. J. 2002. Age at first viral infection determines the pattern of T cell-mediated disease during reinfection in adulthood. *J.Exp.Med.*, 196(10): 1381-1386.
- Dochow, M., Krumm, S. A., Crowe, J. E., Jr., Moore, M. L., & Plemper, R. K. 2012. Independent structural domains in paramyxovirus polymerase protein. *J.Biol.Chem.*, 287(9): 6878-6891.
- Drinka, P. J., Gravenstein, S., Krause, P., Langer, E. H., Barthels, L., Dissing, M., Shult, P., & Schilling, M. 1999. Non-influenza respiratory viruses may overlap and obscure influenza activity. *J.Am.Geriatr.Soc.*, 47(9): 1087-1093.
- Duncan, R. B., Jr. & Potgieter, L. N. 1993. Antigenic diversity of respiratory syncytial viruses and its implication for immunophylaxis in ruminants. *Vet.Microbiol.*, 37(3-4): 319-341.
- El, O. K., Dhaliwal, B., Ren, J., Abrescia, N. G., Lockyer, M., Powell, K. L., Hawkins, A. R., & Stammers, D. K. 2011. Structures of respiratory syncytial virus nucleocapsid protein from two crystal forms: details of potential packing interactions in the native helical form. *Acta Crystallogr.Sect.F.Struct.Biol.Cryst.Commun.*, 67(Pt 10): 1179-1183.
- Falsey, A. R. 2007. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Semin.Respir.Crit Care Med.*, 28(2): 171-181.
- Falsey, A. R. & Walsh, E. E. 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly adults. *Drugs Aging*, 22(7): 577-587.
- Feltes, T. F. & Sondheimer, H. M. 2007. Palivizumab and the prevention of respiratory syncytial virus illness in pediatric patients with congenital heart disease. *Expert.Opin.Biol.Ther.*, 7(9): 1471-1480.
- Fernie, B. F., Dapolito, G., Cote, P. J., Jr., & Gerin, J. L. 1985. Kinetics of synthesis of respiratory syncytial virus glycoproteins. *J.Gen.Virol.*, 66 (Pt 9): 1983-1990.
- Franke-Ullmann, G., Pfortner, C., Walter, P., Steinmuller, C., Lohmann-Matthes, M. L., Kobzik, L., & Freihorst, J. 1995. Alteration of pulmonary macrophage function by respiratory syncytial virus infection in vitro. *J.Immunol.*, 154(1): 268-280.
- Garcia, J., Garcia-Barreno, B., Vivo, A., & Melero, J. A. 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(1): 243-247.

Grosfeld, H., Hill, M. G., & Collins, P. L. 1995. RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *J. Virol.*, 69(9): 5677-5686.

Grosfeld, H., Hill, M. G., & Collins, P. L. 1995. RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *J. Virol.*, 69(9): 5677-5686.

Harrison, M. S., Sakaguchi, T., & Schmitt, A. P. 2010. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 42(9): 1416-1429.

Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K. H., & Oren, M. 1995. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.*, 9(17): 2170-2183.

Heidema, J., de Bree, G. J., de Graaff, P. M., van Maren, W. W., Hoogerhout, P., Out, T. A., Kimpen, J. L., & van Bleek, G. M. 2004. Human CD8(+) T cell responses against five newly identified respiratory syncytial virus-derived epitopes. *J.Gen.Virol.*, 85(Pt 8): 2365-2374.

Jartti, T., Lehtinen, P., Vuorinen, T., Osterback, R., van den Hoogen, B., Osterhaus, A. D., & Ruuskanen, O. 2004. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg.Infect.Dis.*, 10(6): 1095-1101.

Kingsbury, D. W. 1974. The molecular biology of paramyxoviruses. *Med.Microbiol.Immunol.*, 160(2-3): 73-83.

Kondo, T., Yoshida, T., Miura, N., & Nakanishi, M. 1993. Temperature-sensitive phenotype of a mutant Sendai virus strain is caused by its insufficient accumulation of the M protein. *J.Biol.Chem.*, 268(29): 21924-21930.

Kucharski, A. J. & Gog, J. R. 2012. The role of social contacts and original antigenic sin in shaping the age pattern of immunity to seasonal influenza. *PLoS.Comput.Biol.*, 8(10): e1002741.

Lambert, P. H., Liu, M., & Siegrist, C. A. 2005. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? *Nat.Med.*, 11(4 Suppl): S54-S62.

Levine, S., Klaiber-Franco, R., & Paradiso, P. R. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J.Gen.Virol.*, 68 (Pt 9): 2521-2524.

Levine, S., Klaiber-Franco, R., & Paradiso, P. R. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J.Gen.Virol.*, 68 (Pt 9): 2521-2524.

Linton, P. J. & Dorshkind, K. 2004. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat.Immunol.*, 5(2): 133-139.

Liuzzi, M., Mason, S. W., Cartier, M., Lawetz, C., McCollum, R. S., Dansereau, N., Bolger, G., Lapeyre, N., Gaudette, Y., Lagace, L., Massariol, M. J., Do, F., Whitehead, P., Lamarre, L., Scouten, E., Bordeleau, J., Landry, S., Rancourt, J., Fazal, G., & Simoneau, B. 2005. Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.*, 79(20): 13105-13115.

- Llorente, M. T., Garcia-Barreno, B., Calero, M., Camafeita, E., Lopez, J. A., Longhi, S., Ferron, F., Varela, P. F., & Melero, J. A. 2006. Structural analysis of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein: characterization of an alpha-helical domain involved in oligomerization. *J.Gen.Virol.*, 87(Pt 1): 159-169.
- Lo, M. S., Brazas, R. M., & Holtzman, M. J. 2005. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J.Virol.*, 79(14): 9315-9319.
- Lotz, M. T. & Peebles, R. S., Jr. 2012. Mechanisms of Respiratory Syncytial Virus Modulation of Airway Immune Responses. *Curr.Allergy Asthma Rep.*
- Moscona, A. 2005. Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. *J.Clin.Invest*, 115(7): 1688-1698.
- Openshaw, P. J. 2005. Antiviral immune responses and lung inflammation after respiratory syncytial virus infection. *Proc.Am.Thorac.Soc.*, 2(2): 121-125.
- Openshaw, P. J. 2005. Antiviral immune responses and lung inflammation after respiratory syncytial virus infection. *Proc.Am.Thorac.Soc.*, 2(2): 121-125.
- Openshaw, P. J. 2005. Antiviral immune responses and lung inflammation after respiratory syncytial virus infection. *Proc.Am.Thorac.Soc.*, 2(2): 121-125.
- Oshansky, C. M., Zhang, W., Moore, E., & Tripp, R. A. 2009. The host response and molecular pathogenesis associated with respiratory syncytial virus infection. *Future.Microbiol.*, 4(3): 279-297.
- Peret, T. C., Hall, C. B., Schnabel, K. C., Golub, J. A., & Anderson, L. J. 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.
- Pinto, R. A., Arredondo, S. M., Bono, M. R., Gaggero, A. A., & Diaz, P. V. 2006. T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol. *Pediatrics*, 117(5): e878-e886.
- Sabban, S., Ye, H., & Helm, B. 2013. Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity receptor FcγεRI. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, 153(1-2): 10-16.
- Samson, A. C., Willcocks, M. M., Routledge, E. G., Morgan, L. A., & Toms, G. L. 1986. A neutralizing monoclonal antibody to respiratory syncytial virus which binds to both F1 and F2 components of the fusion protein. *J.Gen.Virol.*, 67 (Pt 7): 1479-1483.
- Scheid, A., Hsu, M., & Choppin, P. W. 1980. Role of paramyxovirus glycoproteins in the interactions between viral and cell membranes. *Soc.Gen.Physiol Ser.*, 34: 119-130.
- Schlender, J., Bossert, B., Buchholz, U., & Conzelmann, K. K. 2000. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J.Virol.*, 74(18): 8234-8242.
- Shay, D. K., Holman, R. C., Newman, R. D., Liu, L. L., Stout, J. W., & Anderson, L. J. 1999.

- Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA*, 282(15): 1440-1446.
- Spann, K. M., Tran, K. C., & Collins, P. L. 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(9): 5353-5362.
- Techaarpornkul, S., Collins, P. L., & Peeples, M. E. 2002. Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology*, 294(2): 296-304.
- Tran, T. L., Castagne, N., Dubosclard, V., Noinville, S., Koch, E., Moudjou, M., Henry, C., Bernard, J., Yeo, R. P., & Eleouet, J. F. 2009. The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. *J.Virol.*, 83(13): 6363-6374.
- Tripp, R. A. 2004. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection. *Viral Immunol.*, 17(2): 165-181.
- Wagner, D. K., Nelson, D. L., Walsh, E. E., Reimer, C. B., Henderson, F. W., & Murphy, B. R. 1987. Differential immunoglobulin G subclass antibody titers to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins in adults. *J.Clin.Microbiol.*, 25(4): 748-750.
- Walsh, E. E. & Falsey, A. R. 2012. Respiratory syncytial virus infection in adult populations. *Infect.Disord.Drug Targets.*, 12(2): 98-102.
- Yu, Q., Hardy, R. W., & Wertz, G. W. 1995. Functional cDNA clones of the human respiratory syncytial (RS) virus N, P, and L proteins support replication of RS virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirements for RNA replication. *J.Virol.*, 69(4): 2412-2419.

6 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Hengel als ehemaligem Direktor des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, der mir die Möglichkeit zur Durchführung meiner Dissertation gegeben haben.

In gleichem Maße gilt mein Dank auch Univ.-Prof. Dr. Jörg Timm dem jetzigen Leiter des Instituts Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Ortwin Adams für die interessante Aufgabenstellung sowie für die in jeglicher Hinsicht hervorragende Unterstützung bei der Umsetzung des Projekts.

Des weiteren möchte ich mich bei allen MitarbeiterInnen des Instituts für Virologie bedanken insbesondere bei Frau Iris Herrmann für die exzellente technische Unterstützung und Hilfe bei jeglichen Problemen.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Onkel und meiner Tante, die mir stets ermutigend zur Seite gestanden haben.

Ein besonderer Dank gilt aber meinen Eltern, die mich in allem stets liebevoll unterstützen und mich aufbauen, wenn die Dinge aus dem Runder laufen.

Eidesstattliche Versicherung

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

24.09.2014, Andreas Puck